

[trace fm layout](#) | [Claims](#) | [Description](#)**Patent Number:** DE69233117 D1 20030807

Image unavailable

[Check for mosaic](#) [Translate this page](#)**(D1) IN SICH GESCHLOSSENDE 'SENS-' UND 'ANTISENSE'-
OLIGONUKLEOTIDE UND DEREN VERWENDUNGEN**

An antisense or sense agent of the oligonucleotide type, includes a single-stranded oligonucleotide sequence having a binding affinity for DNA, RNA, or protein selected from the group consisting of (a) a sequence whose ends are linked to one another via covalent linkage to form a closed, single-stranded structure, and (b) a sequence wherein one free end is linked to an internal nucleotide via covalent linkage to form a closed, single-stranded branched structure.

(From US6369038 B1)

Inventor: (D1) BLUMENFELD MARTA (FR)
BRANDYS PASCAL (FR)
D AURIOL LUC (FR)
VASSEUR MARC (FR)**Assignee(s):** GENSET SA (FR)**Patent Assignee History:** (D1) GENSET SA (FR)**Patent number/Stages**

- | | | |
|--|--------------|------------------------------------|
| | DE69233117 | D1 20030807 [DE69233117] |
| | Stage: | (D1) Granted EP number in Bulletin |
| | Assignee(s): | GENSET SA (FR) |
| | DE69233117 | T2 20040415 [DE69233117] |
| | Stage: | (T2) Trans. of EP patent |
| | Assignee(s): | (T2) GENSET SA (FR) |

Priority Nbr: FR9105114 19910425
WOFR9200370 19920424

©Questel



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 692 33 117 T2 2004.04.15

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 581 848 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 692 33 117.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/FR92/00370

(96) Europäisches Aktenzeichen: 92 910 423.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 92/019732

(86) PCT-Anmeldetag: 24.04.1992

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 12.11.1992

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 09.02.1994

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 02.07.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 15.04.2004

(51) Int Cl.⁷: C12N 15/11

A61K 31/70

(30) Unionspriorität:
9105114 25.04.1991 FR

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, MC,
NL, SE

(73) Patentinhaber:
Genset S.A., Paris, FR

(72) Erfinder:
BLUMENFELD, Marta, F-75013 Paris, FR;
BRANDYS, Pascal, F-92150 Suresnes, FR;
D'AURIOL, Luc, F-75019 Paris, FR; VASSEUR,
Marc, F-75013 Paris, FR

(74) Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München

(54) Bezeichnung: IN SICH GESCHLOSSENDE "SENS-" UND "ANTISENSE"-OLIGONUKLEOTIDE UND DEREN VERWENDUNGEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

- [0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen vom Oligonucleotid-Typ sowie ihre Verwendungen.
- [0002] Bei den antisense-Oligonucleotiden (nicht-codierenden Oligonucleotiden) handelt es sich um kurze synthetische DNA- oder RNA-Moleküle mit einer Sequenz, die komplementär zu einer Target-Sequenz ist, die zu einem Gen oder einer messenger-RNA gehört, deren Expression spezifisch blockiert werden soll. Die antisense-Oligonucleotide können gegen eine messenger-RNA-Sequenz gerichtet sein oder können gegen eine DNA-Sequenz gerichtet sein. Die antisense-Oligonucleotide hybridisieren sich mit der Sequenz, zu der sie komplementär sind, und sie können auf diese Weise die Expression der messenger-RNA, die diese Sequenz trägt, blockieren.
- [0003] Der Ausdruck "Oligonucleotid" wird allgemein verwendet, um ein Polynucleotid der Ribo- oder Desoxyribo-Reihe zu bezeichnen. Wenn es sich um die Frage handelt, dass eine spezielle Eigenschaft mit der Verwendung einer Desoxyribo- oder Ribo-Reihe verbunden ist, verwendet man die vollständige Bezeichnung Oligodesoxyribonucleotid oder Oligoribonucleotid. Ein Oligonucleotid kann einzelsträngig (monocatenar) sein, d. h. nur eine Nucleotid-Reihe aufweisen, die nicht mit einer weiteren Kette gepaart ist, oder es kann auch doppelsträngig (bicatenar) sein, d. h. Nucleotide umfassen, die mit einer anderen Polynucleotid-Kette gepaart sind. Zwei komplementäre Oligonucleotide bilden eine doppelsträngige Struktur. Ein einsträngiges Oligonucleotid kann jedoch doppelsträngige Regionen aufweisen durch intracatenare Paarungen zwischen komplementären Sequenzen, die von dem gleichen Strang getragen werden.
- [0004] Der hier verwendete Ausdruck "Hybridisierung" bezeichnet die Bildung von Wasserstoffbindungen zwischen komplementären Basenpaaren, wobei das Guanin und das Cytosin drei Wasserstoffbindungen ausbilden und das Adenin und das Thymin zwei Wasserstoffbindungen ausbilden.
- [0005] Die antisense-Oligonucleotide werden auf chemischem Wege synthetisiert und sie umfassen häufig Modifikationen, die selbst das Grundgerüst des Moleküls verändern oder zusätzliche reaktive Gruppen tragen, die an ihren Enden angeordnet sind. Diese in die antisense-Oligonucleotide eingeführten Modifikationen haben das Ziel, entweder die Beständigkeit (Resistenz) dieser Moleküle gegen nucleolytischen Abbau zu erhöhen oder ihre Wechselwirkungen mit ihren Targets (Zielen) zu fördern oder Abbau/Modifikations-Reaktionen zu ermöglichen, die für Targets (Ziele), RNA oder DNA spezifisch sind, oder ihr Eindringen in die Zellen zu verstärken.
- [0006] Die antisense-Oligonucleotide sind empfindlich gegenüber dem Abbau durch Nucleaseen und hauptsächlich gegenüber der Wirkung von Exonucleaseen. Die Nucleaseen finden sich in allen Zellabschnitten und außerhalb der Zellen, insbesondere in dem Serum, und sie verursachen einen schnellen Abbau dieser Molekül. Eine pharmakologische Verwendung von antisense-Molekülen führt zu einer Lösung dieser Abbau-Probleme, wobei man eine zufriedenstellende Pharmakokinetik und damit eine ausreichende Dauer der Effekte dieser Moleküle erreicht. Durch zahlreiche chemische Modifikationen ist es möglich, die antisense-Oligonucleotide gegen Nucleaseen beständig zu machen. Bestimmte Modifikationen beeinflussen direkt die Struktur oder die Natur der Phosphodiester-Bindung (Methylphosphonate, Phosphorothioate, α -Oligonucleotide, Phosphoramidate, um einige Beispiele zu nennen), andere bestehen darin, dass Blockierungs-Gruppen an die 3'- und 5'-Enden der Moleküle addiert werden (Perbost et al., 1989; Bertrand et al., 1989; Bazile et al., 1989; Andrus et al., 1989; Cazenave et al., 1989; Zon, 1988; Maher and Dolnick, 1988; Gagnor et al., 1987; Markus-Sekura, 1987).
- [0007] Um die Wirksamkeit der Wechselwirkungen zwischen einem Oligonucleotid und seinem Target (Ziel) zu verstärken, kann man einem Ende des antisense-Oligonucleotids eine Interkalations-Gruppe hinzufügen (beispielsweise Acridine). Schließlich kann man den antisense-Oligonucleotiden reaktive Gruppen (z. B. Alkylierungsmittel, Psoralene, Fe-EDTA) hinzufügen, die definitive Einschnitte oder chemische Veränderungen im Bereich des Targets hervorrufen (Sun et al., 1989; Helene, 1989; Durand et al., 1989; Sun et al., 1988; Helene and Thuong, 1988; Verspieren et al., 1987; Sun et al., 1987; Cazenave et al., 1988, 1987; Le Doan et al., 1987; Toulme et al., 1986; Vlassov et al., 1986).
- [0008] Der letzgenannte Typ einer klassischen Modifikation der antisense-Oligonucleotide besteht in einer Addition von Gruppen, welche die Ladung und/oder Hydrophilie der Moleküle modifizieren, um ihren Transmembran-Durchgang zu erleichtern (Kabanov et al., 1990; Degols et al., 1989; Stevenson et al., 1989; Leonetti et al., 1988).
- [0009] Alle diese Modifikationen können offensichtlich miteinander kombiniert werden.
- [0010] Alle Regionen einer messenger-RNA sind nicht in gleicher Weise empfindlich gegenüber den Wirkungen eines antisense-Oligonucleotids. Eine messenger-RNA ist kein festgelegtes lineares Molekül, sondern vielmehr ein Molekül, das zahlreiche sekundäre Strukturierungen (komplexe intramolekulare Hybridisierungen), tertiäre Strukturierungen (spezielle Faltenbildungen und Konformationen, Pseudoknotenpunkte) aufweist und in Wechselwirkung tritt mit strukturellen und funktionellen Nucleoproteinen (z. B. basische Proteine, Religations-, Polyadenylierungs-, Capping-Komplexe, Translations-Komplexe). Die effektive Verfügbarkeit und die Zugänglichkeit verschiedener Regionen für eine messenger-RNA hängt von ihren Beteiligungen an diesen Strukturierungen ab. In entsprechender Weise hängt die Wirksamkeit eines Inhibitor-Agents, das mit der einen

oder anderen Sequenz in Wechselwirkung tritt, ebenfalls von der Beteiligung dieser Sequenzen an einer speziellen Funktion ab. Die Target-Regionen für die antisense-Moleküle müssen für das Oligonucleotid zugänglich sein.

[0011] Die Verwendung von Software-Programmen zur Vorhersage von sekundären Strukturen erlaubt es, theoretische Grade der Zugänglichkeit vorherzusehen und damit die Wahl der Targets auf antisense-Oligonucleotide auszurichten. Allgemein sind die am gebräuchlichsten als Ziele verwendeten Regionen die Translations-Start-Zentren (AUG-Initiatorregion) sowie die Religationszentren (SD/SA-Verbindungsstellen). Zahlreiche andere Sequenzen, die keine speziellen Funktionalitäten aufweisen und nicht an intramolekularen Paarbildungen beteiligt sind, haben sich ebenfalls als wirksam als Target (Ziel) für antisense-Oligonucleotide erwiesen (vgl. die weiter unten folgenden Beispiele).

[0012] Die antisense-Oligodesoxyribonucleotide können ebenfalls gegen bestimmte Regionen der doppelsträngigen DNA gerichtet sein (Homopurin/Homopyrimidin-Sequenzen oder Sequenzen, die reich an Purinen/Pyrimidinen sind) und somit Tripelhelicala bilden (Perroualt et al., 1990; Francois et al. (A), 1989; Francois et al. (B), 1989; Francois et al. (C), 1989; Wang et al., 1989; Maher et al., 1989; Sun et al., 1989; Boidot-Forget et al., 1988; Moser und Dervan, 1987; Dervan, 1986). Oligonucleotide, die somit gegen die DNA gerichtet sind, werden auch als "Antigen" oder als "Anticode" bezeichnet. Die Bildung einer Tripel-Helix im Bereich einer speziellen Sequenz kann die Fixierung von Proteinen blockieren, die in die Expression eines Gens eingreifen und/oder kann die Einführung von irreversiblen Schäden in die DNA ermöglichen, wenn das jeweilige Oligonucleotid eine spezielle reaktive Gruppe aufweist. Solche antisense-Oligonucleotide können zu wirklichen künstlichen Restriktions-Endonucleasen werden, die bei Bedarf gegen spezifische Sequenzen gerichtet sind.

[0013] Die Hybridisierung zwischen einem antisense-Oligonucleotid und einem messenger-RNA-Target kann zu einer Blockierung der Expression auf mehrfache Weise führen, entweder auf sterische Weise oder auf pseudokatalytische Weise (Gagnor et al., 1989; Jesus et al., 1988; Markus-Sekura, 1987):

- die Wechselwirkung zwischen der messenger-RNA und einem komplementären antisense-Oligonucleotid kann eine physische Sperre erzeugen, welche die Fixierung und/oder das Fortschreiten von Proteinen oder Protein-Komplexen, die für die Translation erforderlich sind, in der Reifung oder die Stabilisierung oder einen Transport der messenger-RNA unterbindet. Diese physische Blockierung führt schließlich zu einer Inhibition (Hemmung) der Expression der angezielte messenger-RNA;
- die Hybridisierung zwischen einer messenger-RNA und einem antisense- Oligodesoxyribonucleotid kann zu einem Substrat für die RNase H führen, einem Enzym, das in allen Eukaryonten Zellen vorhanden ist. Die RNase H ist ein Enzym, welche die RNA spezifisch abbaut, wenn sie mit der DNA hybridisiert ist. Die Hybridisierung eines antisense-Oligonucleotids mit einem RNA-Target führt somit zu einem Zerschneiden dieses RNA-Targets an der Stelle der Hybridisierung und somit zu seiner definitiven Inaktivierung;
- darüber hinaus können die antisense-Oligonucleotide, wie weiter oben angegeben, reaktive Gruppen aufweisen, die direkt irreversible Schäden in den Target-RNA-Molekülen erzeugen können.

[0014] Was die gegen die DNA gerichteten antisense-Oligonucleotide angeht, so können diese entweder als Inhibitor für die Fixierung eines Regulationsproteins fungieren, das für die Expression des angezielten Gens unerlässlich ist (beispielsweise der Transkriptionsfaktor), oder sie können irreversible Schäden in das DNA-Molekül einführen (Einschnitte, Querverbindungen), die es lokal ungeeignet machen für die genetische Expression.

[0015] Bei den Ribozymen handelt es sich um RNA-Moleküle, die enzymatische Aktivitäten aufweisen, die insbesondere in der Lage sind, Endonuclease-Schnitte in Target-RNAs hervorzurufen. Ein Ribozym kann als ein spezielles antisense-Oligonucleotid angesehen werden, das eine natürliche katalytische Endonuclease-Aktivität aufweist (Vasseur, 1990; Symons, 1989; Jeffrie und Symons, 1989; Haseloff und Gerlach, 1988; Uhlenbeck, 1987; Symons et al., 1987). In der Regel besteht ein Ribozym aus zwei Abschnitten, einerseits umfasst es eine Sequenz, die komplementär zu der Target-Sequenz ist, die geschnitten werden soll, und andererseits umfasst es eine katalytische Sequenz, die als reaktive Gruppe dient (Fedor und Uhlenbeck, 1990; Uhlenbeck et al., 1989; Sheldon and Symons, 1989; Sampson et al., 1987). Es ist tatsächlich möglich, durch Verwendung einer aktiven Konsensus-Stelle, die von der Sequenz von viralen Ribozymen abgeleitet ist, theoretisch jede beliebige messenger-RNA zu schneiden in einer Position, die vorher festgelegt wird (Haseloff und Gerlach, 1988; Uhlenbeck, 1987). Bei den Ribozymen treten die gleichen Verwendungsprobleme auf wie bei den klassischen antisense-Oligonucleotiden, insbesondere was die Abbau-Phänome angeht, wobei die RNAs noch empfindlicher für den Nucleotid-Abbau sind als die DNAs.

[0016] Die antisense-Oligonucleotide erlauben das spezifische Blockieren der Expression von zellulären messenger-RNAs, beispielsweise von Messengers vom onkogenen Typ (Tortora et al., 1990; Chang et al., 1989; Anfossi et al., 1989; Zheng et al., 1989; Shuttleworth et al., 1988; Cope und Wille, 1989; Cazenave et al., 1989) und von zahlreichen anderen Typen von viralen messenger-RNA, die aus Viren stammen, sowie auch von Varietäten, wie z. B. VSV (Degols et al., 1989; Leonetti et al., 1989), SV40 (Westermann, et al., 1989), Influenza Viren (Kabanov et al., 1990; Zerial et al., 1987), Encephalomyocarditis-Virus (Sankar et al., 1989),

Adenovirus (Mirochnichenko et al., 1989), HSV (Gao et al., 1988) und HIV (Matzukura et al., 1989; Stevenson et al., 1989; Matzukura et al., 1988; Goodchild et al., 1988).

[0017] Mit Ribozymen kann man in vivo eine codierende messenger-RNA schneiden (spalten), für das Marker-Gen CAT (Cameron und Jennings, 1989) den Prozess der Reifung der messenger-RNA von Histon inhibieren (Cotten et al. 1989; Cotten und Birnstiel, 1989) oder die Zelle partiell schützen gegen Infektion durch HIV-1 (Sarver et al., 1990).

[0018] Die Oligonucleotide können auch im Rahmen von Strategien vom "sense"-Typ verwendet werden. Dieses Verfahren besteht darin, ein einzelsträngiges oder doppelsträngiges Oligonucleotid der Desoxyribo- oder Ribo-Reihe mit einer spezifischen Sequenz als Fixierungsmittel für ein Protein zu verwenden, das eine Affinität für die Sequenz aufweist und dessen wirksame Konzentration durch Konkurrenz im Innern von Zellen vermindert werden soll. Man kann auf diese Weise Oligonucleotide verwenden, die mit Transkriptions-Faktoren, viralen Einkapselungs-Faktoren, Translations-Regulations-Faktoren und dgl. in Wechselwirkung treten. Dieses Verfahren wird noch nicht so angewendet, wie dies die klassischere antisense-Strategie ist. In diesem Fall ist das Problem der Stabilität der Oligonucleotide ebenfalls ein wichtiger kritischer Faktor für die Wirksamkeit und das Anhaften ihrer Wirkung. Die Verwendung von modifizierten Oligonucleotiden für ein solches Verfahren kann kollidieren mit strukturellen Problemen der Erkennung durch die Proteine. Die Möglichkeit über stabile natürliche Oligonucleotide in dem Serum und in den Zellen zu verfügen, erlaubt es, gezielte neue therapeutische Wege zu entwickeln, insbesondere in bezug auf die Faktoren zur Regulierung der Affinität gegenüber den Nucleinsäuren.

[0019] Die antisense- und sense-Oligonucleotide stellen somit potentielle, starke und sehr spezifische pharmakologische Agentien dar, die es ermöglichen, die Expression von Messingern zu inhibieren (hemmen), die für Produkte codieren, die pathogene Effekte ausüben. Die therapeutische Verwendung von Oligonucleotiden kollidiert jedoch mit mehreren Problemen vom physiologischen Typ, insbesondere demjenigen der intrazellulären Auslieferung dieser Molekül und demjenigen ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem nucleolytischen Abbau. Die Verwendung von modifizierten Derivaten erlaubt es, das Problem der Empfindlichkeit gegenüber Nucleasen zu überwinden, es wird jedoch ein neues Problem eingeführt, dasjenige der eventuellen Toxizität der in das Molekül eingeführten chemischen Modifikationen.

[0020] Die Verwendung von modifizierten antisense-Oligonucleotiden schafft nämlich Probleme toxikologischer Natur. Auch wenn bestimmte der Modifikationen dafür bekannt sind, dass sie eher neutral sind, ist die Mehrzahl derselben nicht frei von einer potentiellen Toxizität.

[0021] Chemisch modifizierte antisense-Oligonucleotide können eine Toxizität in mehrfacher Hinsicht aufweisen, entweder direkt durch die Effekte des gesamten Moleküls oder indirekt durch die Effekte der Abbauprodukte. Nucleotide, die chemische Modifikationen tragen und in einer Zelle in einer hohen Konzentration vorliegen, können auf diese Weise eine Toxizität darstellen – insbesondere eine Genotoxizität –, die auf dem pharmakologischen Gebiet nicht vernachlässigbar ist.

[0022] Beispielsweise können zahlreiche Probleme, die durch die Verwendung von modifizierten antisense-Oligonucleotiden auftreten, insbesondere nicht Sequenzspezifische antivirale Effekte, zurückzuführen sein auf die Natur bestimmter chemischer Modifikationen, die in die antisense-Oligonucleotide eingeführt worden sind, um sie gegen Nucleasen beständig (resistant) zu machen.

[0023] Auf dem toxikologischen Gebiet ist es somit klar, dass, je weniger man die natürliche Struktur des Oligonucleotids modifiziert, umso geringer die Gefahr ist, pharmakologischen Problemen gegenübergestellt zu sein. Ein natürliches DNA- oder RNA-Molekül sowie seine Abbauprodukte schaffen somit keine oder kaum toxikologische und pharmakokinetische Probleme, was nicht der Fall ist bei einer modifizierten Struktur, die nach der Verstoffwechselung der vielfältigen und potentiell toxischen Derivate auftreten können.

[0024] Es wäre somit vorteilhaft, über natürliche Oligonucleotide zu verfügen, die nur normale Desoxy- oder Ribonucleotide umfassen, die durch eine normale Phosphodiesterbindung miteinander verbunden sind, die jedoch eine Beständigkeit gegen Abbau aufweisen.

[0025] Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, einen neuen Typ einer antisense- oder sense-Oligonucleotid-Struktur zu schaffen, der gegen Exonucleasen beständig ist, ohne dass stabilisierende chemische Modifikationen vorliegen. Die den Gegenstand der Erfindung bildenden Oligonucleotide haben die Besonderheit, dass sie eine geschlossene Struktur aufweisen, die kein für den Exonuclease-Abbau verfügbares (zugängliches) Ende aufweisen.

[0026] Solche Oligonucleotide können in ihrem natürlichen Zustand verwendet werden, sie können jedoch auch modifizierte Nucleotide, reaktive Gruppen umfassen oder physikalisch mit anderen Molekülen oder Makromolekülen assoziiert sein mit dem Ziel, ihre Inhibierungswirksamkeit, ihre Penetration, ihre Affinität für ihre Targets, ihre zelluläre oder intrazelluläre Zielrichtung zu verstärken oder jede andere Eigenschaft zu optimieren.

II. Beschreibung der Erfindung

[0027] In den Zellen und noch mehr in einem Organismus, beispielsweise in dem Blutkreislauf, sind die natürlichen antisense-Oligonucleotide empfindlich gegenüber Nucleaseen. Bei den Nucleaseen handelt es sich um Abbauenzyme, welche die Phosphodiester-Bindungen der DNA oder der RNA schneiden (spalten) können, entweder durch Einführung von internen Schnitten an einsträngigen oder doppelsträngigen Molekülen oder durch Angreifen dieser Moleküle an ihren Enden. Die von innen angreifenden Enzyme werden als Endonucleasen bezeichnet und diejenigen, welche über die Enden angreifen, werden als Exonucleasen bezeichnet.

[0028] Die Stabilität der antisense-Oligonucleotide – somit ihre Wirksamkeit – kann beträchtlich verbessert werden durch Einführung verschiedener chemischer Modifikationen, um sie gegen Abbau beständig zu machen, wie vorstehend beschrieben. Es ist anerkannt, dass es die Exonucleasen sind, welche die Hauptursache für den Abbau der antisense-Oligonucleotide im Serum und in der Zelle sind. Insbesondere scheint es, dass die Exonucleasen, die am 3'-OH-Ende angreifen, vor allem an diesem Phänomen beteiligt sind.

[0029] Modifikationen, die an der Struktur der Enden der antisense-Oligonucleotide vorgenommen worden sind, können sie schützen, die Aktivitäten der Exonucleasen blockieren und den Oligonucleotiden eine erhöhte Stabilität verleihen.

[0030] Die hier beschriebene Erfindung basiert auf dem neuen Gedanken, dass geschlossene Oligonucleotide, die keine freien Enden aufweisen, somit per definitionem beständig (resistant) sind gegen diesen Abbau-Typ. Geschlossene Oligonucleotide, beispielsweise zirkuläre (cyclische) Oligonucleotide, weisen kein Substrat auf, das für die 3'- oder 5'-Exonucleasen zugänglich ist und sind somit stabilisiert.

[0031] Insbesondere betrifft die Erfindung somit ein antisense- oder sense-Agens vom Oligonucleotid-Typ, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es besteht aus einer oder mehreren einzelsträngigen Oligonucleotid-Sequenzen, deren Enden durch kovalente Bindungen miteinander verbunden sind unter Bildung mindestens partiell einer geschlossenen einzelsträngigen Struktur.

[0032] Diese Agentien (Mittel) werden gelegentlich nachstehend als geschlossene Oligonucleotide oder zirkuläre (cyclische) Oligonucleotide bezeichnet, sofern dieser Verbindungs-Typ vorzugsweise eine Mehrzahl von Nucleotiden aufweist gegenüber Nicht-Nucleotid-Strukturen.

[0033] Die Definition des Ausdrucks Oligonucleotid wurde bereits weiter oben gegeben und sie umfasst auch die natürliche Ribo- und Desoxyribo-Reihe sowie die Modifikationen dieser Basen, die nachstehend allgemein als nicht natürlich bezeichnet werden und oben ebenfalls bereits angesprochen worden sind.

[0034] Die kovalente Bindung kann eine kovalente Protein-, Lipid-, Knochen-Nicht-Nucleotid-Struktur und/oder eine gemischte Struktur sein, wie dies nachstehend näher erläutert wird. Bevorzugt verwendet man jedoch eine kovalente Nucleotid-Struktur, d. h. eine Phosphodiester-Bindung.

[0035] Die Erfindung betrifft geschlossene Oligonucleotide, beispielsweise zirkuläre (cyclische) Oligonucleotide, die keine freien Enden haben, jedoch aus einer Folge von Nucleotidbasen bestehen, die durch beliebige Bindungs-Typen miteinander verbunden sind, vorzugsweise durch Bindungen vom Phosphodiester-Typ. Diese Basen können durch Bindungen so miteinander assoziiert sein, dass der Abstand zwischen diesen Basen etwa 3 Å bis 4 Å beträgt, bei dem es sich um den Abstand handelt, den man in den natürlichen DNA- oder RNA-Molekülen findet, wenn die Internucleotid-Bindungen durch Phosphodiester-Gruppen gebildet werden. Die geschlossenen Oligonucleotide, beispielsweise die zirkulären (cyclischen) Oligonucleotide, sind zweckmäßig zusammengesetzt aus natürlichen Nucleotiden, die vorzugsweise durch nicht-modifizierte Phosphodiester-Bindungen miteinander verbunden sind, sie können aber auch modifizierte Nucleotide und/oder modifizierte Bindungen umfassen, welche die Abstände zwischen den Basen einhalten und die axialen Helix-Rotationen ermöglichen; die charakteristisch für Konformationen der Nucleinsäuren sind. Die geschlossenen Oligonucleotide sind somit zweckmäßig zusammengesetzt aus den Basen A, T, G, C oder U in ihren Desoxy- oder Ribonucleotid-Formen. Die geschlossenen Oligonucleotide können somit Oligodesoxyribonucleotide oder Oligoribonucleotide oder gemischte Moleküle sein, die Desoxyribonucleotide und Ribonucleotide umfassen.

[0036] Die Erfindung umfasst somit jedes DNA- oder RNA-Molekül – oder gemischte DNA/RNA-Moleküle – die einzelsträngig, geschlossen, zirkulär (cyclisch) sind oder einen zirkulären Abschnitt aufweisen, die auf biologische, chemische Weise oder unter Anwendung von Verfahren erhalten werden, welche die Methoden der chemischen Synthese mit denjenigen der biologischen und biochemischen Synthese kombinieren, die eine Beständigkeit gegenüber Exonucleasen aufweisen, die höher ist als diejenige eines Oligonucleotids mit der gleichen Sequenz, das jedoch vollständig linear ist und keine geschlossene Struktur aufweist. Beispiele für geschlossene Oligonucleotide sind in den **Fig. 1A** bis **1C** dargestellt.

[0037] Die **Fig. 1A** zeigt Beispiele für geschlossene antisense-Oligonucleotid-Strukturen. Die **Fig. 1B** zeigt Beispiele für geschlossene sense-Oligonucleotid-Strukturen. Die **Fig. 1C** zeigt ein gemischtes Molekül, das einen sense- und einen antisense-Effekt ausüben kann.

[0038] Die Anzahl Nucleotid-Einheiten, welche die geschlossenen Oligonucleotide aufbauen, kann in breiten Bereichen variieren, insbesondere zwischen 10 und 200, diese Anzahl liegt aber zweckmäßig beispielsweise zwischen etwa zwanzig und etwa fünfzig Nucleotiden je nach Schließ-Struktur (zirkuläre Struktur, Lasso-Struk-

tur, Ballon-Struktur, doppelsträngige Struktur und dgl., vergleiche die weiter unten folgenden Beschreibungen der verschiedenen Strukturen), je nach den Verwendungen (Anti-RNA-antisense-Molekül, Anti-DNA-anti-sense-Molekül, Anti-Protein-sense-Molekül), je nach Desoxy- oder Ribonucleotid-Typ (einfach antisense oder Ribozymantisense und dgl.) und je nach den jeweiligen Targets (RNA-messenger, RNA-Premessenger, spezielle Sekundärstruktur und dgl.).

[0039] Die den Gegenstand der vorliegenden Erfindung bildenden geschlossenen Oligonucleotide sind vorzugsweise zusammengesetzt aus einer Basen-Sequenz, die Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T) und Uracil (U) umfasst, welche die in der **Fig. 1 D** angegeben allgemeinen Formeln haben.

[0040] Die geschlossenen Oligonucleotide können auch seltene Nucleotide umfassen (z. B. Inosin (I) oder (rI)) oder sie können modifizierte Nucleotide umfassen entweder der Desoxyribo- oder der Ribo-Reihe.

[0041] Die geschlossenen Oligonucleotide können Nucleotide umfassen, die im Bereich der Phosphodiester-Bindung modifiziert sind, beispielsweise entsprechend den in der **Fig. 2** dargestellten Formeln. Beispielsweise können die geschlossenen Oligonucleotide eine oder mehrere bekannte Gruppen aufweisen, wie z. B. die Phosphorothioate, die Methylphosphonate, die Phosphorodithioate, die Phosphoselonate, die Phosphoramidate, die Alkylphosphotriester. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die geschlossenen antisense-Oligonucleotide vorzugsweise natürliche Nucleotide umfassen, die durch nicht-modifizierte Phosphodiester-Bindungen miteinander verbunden sind.

[0042] Die geschlossenen Oligonucleotide können reaktive Nucleotide umfassen, die mit der Sequenz des Target-Moleküls, die komplementär zu dem Oligonucleotid ist, Bindungen ausbilden können.

[0043] So können die geschlossenen Oligonucleotide auf die Nucleotide aufgeproppte reaktive Gruppen tragen, wie z. B. Psoralen-Gruppen oder andere brückenbildende Agentien oder Interkalierungs-Agentien, die mit der Sequenz des Target-Moleküls reagieren können, die komplementär zu dem Oligonucleotid ist (vgl. die in der **Fig. 2** darstellten nicht erschöpfenden Beispiele).

[0044] Die geschlossenen antisense-Oligonucleotide können auch unter den Nucleotiden, die einen Teil der geschlossenen Struktur bilden, eine RNA Sequenz enthalten, die eine katalytische Aktivität aufweist. Diese zirkulären (kreisförmigen) Oligonucleotide stellen somit zirkuläre Ribozyme dar, die an den miteinander verbundenen Enden über die katalytische Sequenz hinaus jede RNA-Sequenz umfassen können, die ein Schneiden oder eine Modifikation in einer Target-RNA-Sequenz, eine Sequenz vom antisense-Typ, die komplementär zu der Target-Sequenz ist, hervorrufen können und die aufgebaut sein können aus RNA oder DNA oder einer Mischung von DNA und RNA (**Fig. 3**).

[0045] Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind außerdem geschlossene Oligonucleotide, die mit Molekülen gekoppelt sind, die ihre intrazelluläre Penetration verstärken können und insbesondere mit lipophilen Gruppen, Polypeptiden oder Proteinen verbunden (gekoppelt) sein können.

[0046] Die geschlossenen Oligonucleotide weisen das Hauptcharakteristikum auf, dass sie für die 3'- und 5'-Exonucleasen kein Substrat darstellen. Um diese Eigenschaft zu erwerben, ist die einfachste Struktur ein zirkuläres (cyclisches) Oligonucleotid, das von einer Folge von Nucleotiden gebildet wird, die durch Phosphodiester-Bindungen miteinander verbunden sind, wie weiter oben schematisch dargestellt, und die intracatenäre Paarungen aufweisen oder nicht aufweisen (**Fig. 1A** bis **1C** und **Fig. 4**).

[0047] Andere Molekülstrukturen, die durch eine Nicht-3'-5'-Phosphodiester-Bindung geschlossen sind, können ebenfalls synthetisiert werden und weisen eine partielle Beständigkeit (Resistenz) oder eine vollständige Beständigkeit (Resistenz) gegenüber Exonucleasen auf.

[0048] Gegenstand der Erfindung sind außerdem Lasso-Moleküle, die bestehen aus Desoxy- oder Ribonucleotid-Resten und die geschlossen sind entweder durch eine Bindung, die entweder das 3'-Ende oder das 5'-Ende des Moleküls erfasst (**Fig. 1A** bis **1C** und **Fig. 4B**). In diesen Lasso-Molekülen kann der lineare Abschnitt nur einen einzigen Nucleotid-Rest umfassen oder er kann eine Nucleotid-Seitenkette von mehreren Resten umfassen. In diesen Strukturen ist eines der terminalen Nucleotide des Oligonucleotids an ein inneres Nucleotid gekoppelt durch eine Bindung, die mit der Base oder mit dem Zucker oder mit der Phosphodiester-Gruppe entstehen kann. Solche Oligonucleotide weisen ein freies Ende und ein blockiertes Ende auf. Die Beständigkeit gegenüber Exonucleasen ist somit partiell, da das freie Ende Ziel eines nucleolytischen Abbaus sein kann. Die 5'- und 3'-Enden der Oligonucleotide sind nicht auf äquivalente Weise empfindlich gegen Abbau, da das 3'-Ende empfindlicher ist. Ein zirkuläres Lasso-Oligonucleotid, das nur ein freies 5'-Ende aufweist, ist großteils gegen Abbau geschützt. Darüber hinaus werden die Exonucleasen, die den linearen Teil des Lassos abbauen können, im Bereich des Verzweigungspunktes gestoppt. In diesem Zustand ist das Oligonucleotid gegenüber 3'- und 5'-Exonucleasen vollständig beständig, unabhängig davon, welches ursprünglich das freie oder verzweigte Ende war. Solche Lasso-Moleküle können natürliche oder modifizierte Nucleotid-Reste umfassen, wie in dem vorhergehenden Absatz weiter oben angegeben. Die generelle Struktur der Lasso-Moleküle ist in der **Fig. 1A** und in der **Fig. 4B** darstellt.

[0049] Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind außerdem ballonförmige geschlossene Oligonucleotide, wie sie in der **Fig. 1A**, in der **Fig. 1B** und in der **Fig. 4C** dargestellt sind. Diese Oligonucleotide sind durch eine chemische Bindung geschlossen, die einer intercatenaren Brückenbindung entspricht, die zwischen zwei in-

ternen Nucleotiden entstanden ist. Diese Brückenbindung kann erfolgen durch Einwirkung eines reaktiven Nucleotids – beispielsweise eines durch Licht aktivierbaren Nucleotids – oder auch durch Verwendung eines exogenen Reagens, das zwischen zwei gepaarten Regionen des Oligonucleotids eine Bindung ausbildet. Ein solches Ballon-Oligonucleotid weist nur eine begrenzte oder keine Anzahl von Substrat-Stellen für Exonucleasen auf. Aber selbst wenn die Brückenbindung(en), die das Oligonucleotid-Molekül schließen, nicht im Bereich der End-Nucleotide vorliegen, sind nur einige Nucleotide, die beiderseits des Brückenbildungspunktes an den Enden des Moleküls angeordnet sind, für die Exonucleasen zugänglich. Die Exonucleasen können die Phosphodiester-Bindungen öffnen (spalten), welche die Nucleotide miteinander verbinden, deren Enden nicht gekoppelt sind, sie werden jedoch gestoppt an der Brückenbindungs-Stelle. Die an der Brückenbindung beteiligten Nucleotide sind teilweise oder vollständig beständig gegenüber Exonucleasen und schützen so das Oligonucleotid gegen das Fortschreiten des nucleolytischen Abbaus.

[0050] Gegenstand der Erfindung ist außerdem eine andere (weitere) Familie von zirkulären (cyclischen) Oligonucleotiden, die an ihren Enden mittels eines Nicht-Nucleotid-Moleküls geschlossen sind. Diese geschlossenen Oligonucleotide weisen einen Abschnitt ihrer Molekülstruktur auf, der einer DNA- oder RNA-Sequenz entspricht, in der die Basen nicht modifiziert sind und deren erste Nucleosid-Einheit mit der letzten verbunden ist durch eine Bindung, die eine beliebige Molekülstruktur darstellt. Beispielsweise können die Antisense-Oligonucleotide mittels einer Kupplung zwischen den endständigen Nucleotiden durch eine Protein- oder Peptid-Struktur zirkularisiert (cyclisiert) sein, die durch jeden beliebigen Kupplungs-Typ mit der endständigen Nucleosid-Einheit verbunden sein können (**Fig. 4**).

[0051] Gegenstand der Erfindung sind außerdem zirkuläre (cyclische) Oligonucleotide, die einen Nucleotid-Abschnitt und einen Protein-Abschnitt aufweisen. Die Einführung dieses Protein-Abschnitts kann nach verschiedenen Kupplungsverfahren erfolgen. Der Protein-Anteil kann so konzipiert sein, dass er die Wirksamkeit des Nucleotid-Moleküls durch verschiedene Mechanismen verstärkt. Der Protein-Abschnitt kann beispielsweise die Internalisierung des Oligonucleotids innerhalb der Zellen fördern, wodurch gegebenenfalls bestimmte Zellen anvisiert werden können durch Auswahl einer verwendeten Protein-Determinante. Die in den zirkulären Oligonucleotiden dieses Typs verwendeten Protein- oder Peptid-Bestandteile können auch Signalgebungs-Moleküle sein, die das intrazelluläre Anzielen von Oligonucleotiden erlauben. Beispielsweise kann man nucleare Adressierungs-Peptide verwenden, die aus natürlichen zellulären oder viralen Proteinen stammen. Dieser Aspekt der Erfindung besteht darin, Oligonucleotide mit einer neuen Struktur vorzuschlagen, die Verbindungen umfassen, die mit speziellen Rezeptoren der Oberflächenmembran der Zelle spezifisch reagieren können, die durch die genannten Zellen internalisiert werden und ihre biologische Aktivität auf das Innere der Zelle ausüben.

[0052] Gegenstand der Erfindung sind außerdem zirkuläre (kreisförmige) Oligonucleotide, die in sich selbst geschlossen sind durch lipophile Gruppen oder Ketten, die lipophile Reste aufweisen, und die zelluläre Internalisierung dieser Moleküle fördern.

[0053] Gegenstand der Erfindung sind außerdem geschlossene Oligonucleotide, die mit kovalenten oder nicht-kovalenten Kupplern kombiniert sind mit Einkapselungsstrukturen vom Liposom-Typ oder irgendeiner anderen Lipoprotein- oder Lipopolysaccharid-Struktur.

[0054] Gegenstand der Erfindung sind ferner zirkuläre (cyclische) Oligonucleotide, die in sich selbst geschlossen sind durch eine Phosphodiester-Bindung, die jedoch darüber hinaus eine oder mehrere interne Bindungen aufweisen, die durch reaktive Agentien ausgebildet werden, die zur Struktur der Moleküle selbst gehören oder von außen zugeführt werden.

[0055] Diese Moleküle weisen die Beständigkeitseigenschaften der zirkulären Oligonucleotide gegenüber Exonucleasen auf und weisen darüber hinaus spezielle sekundäre Konformationen auf, die an die Erkennung von speziellen Stellen auf Targets angepasst werden können, die selbst spezielle sekundäre oder tertiäre Konformationen aufweisen, sei es, dass diese Targets Nucleinsäuren sind oder irgendeine andere zelluläre oder virale Struktur, die eine elektive und selektive Affinität gegenüber einem Polynucleotid mit einer speziellen primären und sekundären Struktur aufweisen können.

[0056] Gegenstand der Erfindung sind außerdem zirkuläre (cyclische) oder geschlossene antisense-Oligonucleotide, die mit der Target-RNA eine Tripelhelix bilden können. Die Bildung einer Tripelhelix erlaubt die Stabilisierung der DNA/RNA-Wechselwirkung zwischen der antisense-Sequenz und der Target-Sequenz. Allgemein kann man sagen, dass ein zirkuläres antisense-Oligonucleotid eine "Prodruck"-Verbindung gegenüber einem linearen antisense-Oligonucleotid ist. Das Schneiden eines zirkulären Oligonucleotids führt zur Entstehung eines linearen Oligonucleotids, das eine klassische antisense-Wirkung mit Verzögerung ausüben kann. Obgleich die erfindungsgemäßen Verbindungen ziemlich häufig Nucleotid-Sequenzen aufweisen, die kein Selbstpaarungsvermögen besitzen, sind ein weiterer Gegenstand der Erfindung geschlossene Oligonucleotide, die selbstpaarende Regionen aufweisen, die eine doppelsträngige Struktur mit einer variablen Länge bilden (vgl. **Fig. 5**). Diese doppelsträngige Struktur kann mehrere Rollen spielen, beispielsweise diejenige eines Stabilisators für das Molekül, um seine Zirkularisierung (Cyclisierung) zu ermöglichen bei der Synthese der zirkulären (cyclischen) Moleküle (vgl. die weiter unten beschriebenen Herstellungsverfahren). Diese doppelsträngige

Struktur kann auch eine aktive Rolle spielen beispielsweise diejenige, mit Proteinen in Wechselwirkung zu treten, die eine Affinität für diese Sequenz aufweisen. Die doppelsträngige Struktur kann einer Fixierungssequenz für Protein-Faktoren entsprechen. Ein Aspekt der Erfindung besteht insbesondere darin, stabile natürliche Oligonucleotid-Moleküle zur Verfügung zu stellen, die zelluläre oder virale Faktoren fixieren können und somit in biologische Prozesse eingreifen können, um diese Faktoren zu steuern.

[0057] Ein Beispiel für die Verwendung von geschlossenen Oligonucleotiden, die eine Selbstpaarungs-Region aufweisen – Oligonucleotide, die für eine solche Anwendung bestimmt sind, sind zweckmäßig einfach zirkulär (cyclisch) – ist die intrazelluläre Konkurrenz mit Transkriptions-Faktoren. In diesem Fall trägt der doppelsträngige Abschnitt des geschlossenen Oligonucleotids die Fixierungssequenz für den Transkriptions-Faktor, für den Regulator, für den hormonalen Nuclear-Rezeptor, den man festzuhalten wünscht. Die Wechselwirkung zwischen dem doppelsträngigen zirkulären Oligonucleotid und einem Transkriptions-Faktor führt zu einer Herabsetzung der intrazellulären Verfügbarkeit dieses Faktors und somit zu einer Modifizierung der Regulierungs-Gleichgewichte, in die dieser Faktor eingreift. Wenn es sich dabei um einen positiven Transkriptions-Faktor handelt, der eine Stimulierungswirkung ausübt, führt die Blockierung dieses Faktors zu einer Inhibition der in Betracht gezogenen Gene; wenn es sich dabei um einen negativen Faktor handelt, der die Expression von Genen nach der Wechselwirkung mit der zellulären DNA inhibiert, dann wird die Expression dieser Gene stimuliert. Allgemein können die geschlossenen Oligonucleotide vom zirkulären (cyclischen) Typ der Desoxyribo-Reihe, die einen doppelsträngigen Abschnitt aufweisen, mit jedem Protein-Faktor, der eine Affinität für DNA aufweist und dessen Wirkungen in einer gegebenen pathologischen Situation man zu verringern oder zu verändern wünscht, in therapeutische Ziele eingreifen.

[0058] Es ist auch möglich, geschlossene Oligonucleotide, zweckmäßig zirkuläre (cyclische) Oligonucleotide, zu verwenden, um antisense- und sense-Verfahren miteinander zu kombinieren mit dem Ziel einer höheren Wirksamkeit. Dieses Verfahren besteht darin, gleichzeitig ein geschlossenes antisense-Oligonucleotid, das gegen die messenger-RNA eines Transkriptions-Faktors gerichtet ist, und ein geschlossenes sense-Oligonucleotid zu verwenden, das eine doppelsträngige Struktur mit einer Sequenz aufweist, die der Fixierungsstelle der DNA dieses Transkriptions-Faktors entspricht. Zwei Wirkungen werden somit gleichzeitig in synergistischer Weise angestrebt an dem gleichen Target-Molekül, wobei das antisense-Molekül die Synthese dieses Faktors herabsetzt und das sense-Molekül eine Einfangwirkung auf die verbleibenden Moleküle ausübt, die noch vorliegen können. Die kombinierten senseund antisense-Verfahren können angewendet werden entweder um das gleiche Protein anzusprechen in zwei verschiedenen Expressions- und Funktionalitäts-Bereichen oder um zwei verschiedene Proteine anzugreifen mit dem Ziel, die höchste Wirksamkeit des Verfahrens zu ermitteln.

[0059] Bei diesem Verfahren kann Gebrauch gemacht werden von der gleichzeitigen Verwendung von zwei verschiedenen Molekülen, einem sense-Molekül und einem antisense-Molekül, oder auch von nur einem geschlossenen Oligonucleotid-Molekül, wie es in der **Fig. 1C** dargestellten ist.

[0060] Ein weiteres Beispiel für die Verwendung von geschlossenen Oligonucleotiden ist die intrazelluläre Konkurrenz mit Affinitäts-Faktoren für bestimmte doppelsträngige RNA-Sequenzen. Dies ist der Fall für bestimmte Regulator-Proteine, die in Wechselwirkung treten mit den messenger-RNA, insbesondere mit den viralen messenger-RNA. Es kann beispielsweise der Fall des Produkts des Gens tat von HIV genannt werden, das in einer doppelsträngigen Region des 5'-Endes der viralen messenger-RNA fixiert wird. Um als Agentien verwendet werden zu können, die im Falle dieses Beispiels mit tat in Wechselwirkung treten, umfassen die geschlossenen Oligonucleotide – beispielsweise zirkuläre Oligonucleotide – einen doppelsträngigen Abschnitt der Ribo-Reihe, wobei der Rest des Oligonucleotids aus Nucleotiden der Ribo-Reihe oder der Desoxyribo-Reihe besteht. Allgemein können die den Gegenstand der Erfindung bildenden geschlossenen Oligonucleotide als stabilisierte Moleküle zum Fixieren von Protein-Faktoren verwendet werden, die eine Affinität für die einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nucleinsäuren DNA oder RNA darstellen, indem man gleichzeitig die Primärstruktur (Sequenz) der Affinitäts-Stellen und die eventuellen Sekundärstrukturen (beispielsweise Haarnadel-förmige Strukturen, kreisförmige Strukturen) imitiert. Solche geschlossenen Oligonucleotide, zweckmäßig zirkuläre Oligonucleotide, die eine Nucleotid-Sequenz aufweisen, die von Protein-Faktoren erkannt wird, können auch reaktive Gruppen tragen, die mit den mit ihnen in Wechselwirkung tretenden Proteinen spontane oder durch Licht aktivierbare Brückenbindungen ausbilden können.

[0061] Ein Aspekte der Erfindung, wie er im vorhergehenden Paragraphen detailliert beschrieben worden ist, besteht somit darin, neue stabile natürliche Oligonucleotide zur Verfügung zu stellen, die in den Zellen internalisiert werden können und anschließend in Wechselwirkung treten können mit Zelfaktoren oder viralen Faktoren, die eine Affinität für spezifische Nucleinsäure-Sequenzen aufweisen.

[0062] Gegenstand der Erfindung sind außerdem zirkuläre (cyclische) Oligonucleotide, die paarweise miteinander kombiniert sind aufgrund der Komplementarität ihrer Sequenzen unter Bildung einer vollständigen oder partiellen doppelsträngigen zirkulären Struktur (die Nicht-Paarungen, auch als "Fehlanpassungen" bezeichnet, aufweisen können) und die gegenüber Exonucleaseen beständig (resistant) sind. Diese zirkulären doppelsträngigen Oligonucleotide können aus natürlichen, seltenen, künstlichen oder modifizierten Nucleotiden der Desoxyribo- oder Ribo-Reihe aufgebaut sein. Diese doppelsträngigen zirkulären Oligonucleotide können aus DNA

der Form I oder DNA der Form V aufgebaut sein, d. h. Verbundstrukturen vom Typ B und Z aufweisen. Die DNA der Form I ist die super-eingerollte zirkuläre DNA, deren beide Stränge ineinander verflochten sein können. Die DNA der Form V ist eine DNA, deren komplementäre Stränge nicht miteinander verflochten sind, d. h. eine DNA, die aus zwei komplementären Strängen besteht, die nebeneinander liegen. Die doppelsträngige DNA kann unterschiedliche Konformationen A, B oder Z annehmen. Die natürlichste Form und die häufigste Form der DNA ist eine gerade Helix vom Typ B, während die Form Z, die weniger häufig ist, eine linksgewendete Helix ist, die länger ist als die Form B. Eine zirkuläre (cyclische) Struktur, z. B. eine solche, wie sie oben beschrieben worden ist, umfasst zwei nicht miteinander verflochtene komplementäre Stränge, die gleichzeitig linksgewendete und rechtsgewendete Helica aufweisen. Ein solches doppelsträngiges zirkuläres Oligonucleotid kann als Agens vom sense-Typ verwendet werden, um mit Proteinen in Wechselwirkung zu treten, die eine Affinität für eine spezielle Sequenz aufweisen, die auf dem in Betracht gezogenen Oligonucleotid vorhanden ist. Ein solches doppelsträngiges zirkuläres Oligonucleotid, insbesondere der Ribo-Reihe, kann auch als Immunostimulans genereller Art und insbesondere als Agens zur Induktion von Interferonen verwendet werden. Es sei darauf hingewiesen, dass diese potentielle Immunstimulierungs-Funktion, die bestimmte RNAs aufweisen, ebenfalls ausgenutzt werden kann durch Verwendung von einzelsträngigen zirkulären Oligonucleotiden, die selbst-gepaarte doppelsträngige Strukturen aufweisen aufgrund der inneren Komplementaritäten der Sequenz und bei denen teilweise der Vorteil ausgenutzt wird, dass sie einer zirkulären Struktur eine Beständigkeit (Resistenz) gegenüber Exonucleasen verleiht.

III. Herstellung von geschlossenen Oligonucleotiden

[0063] Die geschlossenen Oligonucleotide, die den Gegenstand der Erfindung bilden, können auf chemischem, biologischem Wege oder durch Verfahren erhalten werden, bei denen man Kombinationen von chemischen Syntheseverfahren und molekularbiologischen Verfahren anwendet.

[0064] Die geschlossenen Oligonucleotide können somit hergestellt werden entweder aus linearen Oligonucleotiden, die anschließend durch chemische oder biologische Verfahren geschlossen werden, oder direkt als Oligonucleotide auf chemischem Wege, wobei eine Reaktion angewendet wird, die zur Cyclisierung des Moleküls führt. Diese beiden Methoden werden nachstehend nacheinander diskutiert.

1. Herstellung von zirkulären (cyclischen) Oligonucleotiden aus linearen Oligonucleotiden durch Ligations-Verfahren

[0065] Es wurden verschiedene Verfahren zur chemischen Synthese von natürlichen Oligonucleotiden entwickelt und sie sind den Spezialisten, die nach den Regeln der Kunst arbeiten, bekannt. Ein Verfahren besteht beispielsweise darin, dass man einen festen Träger, so genanntes CPG (kontrolliertes Porenglas), verwendet, auf dem das erste Nucleotid kovalent durch einen Kupplungsarm fixiert wird mittels seines 3'-OH-Endes. Das 5'-OH-Ende des Nucleosids ist durch eine säurelabile Di-p-methoxytrityl-Gruppe geschützt. Dieses Verfahren, bei dem die Chemie der Triester-Phosphite ausgenutzt wird und bei der 3'-Phosphoramidit-Deoxynucleoside als Synthone verwendet werden, wird als Phosphoramidit-Verfahren bezeichnet (Caruthers, 1985). Dieses Verfahren ist das derzeit am häufigsten angewandte Verfahren und bietet den Vorteil, dass es vollständig automatisch abläuft. Die Synthese eines Oligonucleotids aus einer ersten Einheit, die an CPG fixiert ist, beginnt mit einer Schutzgruppen-Entfernungsstufe, in deren Verlauf die Trityl-Gruppe eliminiert wird, dann wird eine an ihrer 5'-Gruppe aktivierte Nucleosid-Einheit hinzugefügt, wobei die nicht-reaktiven Produkte blockiert sind, dann beginnt ein neuer Schutzgruppen-Entfernungs/Aktivierungs/Kupplungs-Zyklus. In der Regel erfolgt die Addition eines Desoxynucleotids unter Anwendung der vier folgenden Stufen: i) Schutzgruppen-Entfernung und Eliminierung einer Dimethoxytrityl-Schutzgruppe mit einer Säure, ii) Kondensation des resultierenden Produkts mit einem 3'-Phosphoramidit-Desoxynucleosid unter Bildung eines Desoxydinucleosidphosphitesters, iii) Acylierung, d. h. Blockierung der 5'-Hydroxylgruppen, die nicht reagiert haben, und iv) Oxidation des Phosphitesters zu einem Phosphatetriester. Die Wiederholung dieser Zyklen führt zu der Synthese von Oligonucleotiden, die mehr als 200 Einheiten erreichen können.

[0066] Um ein zweites Beispiel zu nennen besteht ein anderes Verfahren, das für die Synthese von Oligonucleotiden angewendet wird, in einer Anwendung der Chemie der Phosphonate (Froehler et al., 1986). Dieses Verfahren beginnt mit der Kondensation eines Desoxynucleosid-3'-H-phosphonats mit einem Deoxynucleosid, das mit einem Siliciumdioxid-Glasträger gekoppelt ist. Aufeinanderfolgende Kondensationszyklen führen zur Synthese von Oligonucleotid-H-phosphonaten. Diese Oligonucleotide werden in einer Stufe oxidiert unter Bildung der Phosphodiester.

[0067] Durch Anwendung der einen oder der anderen dieser Methoden oder irgendeines anderen sequentiellen Verfahrens, das die chemische Synthese von Polynucleoid-Ketten mit einer im Voraus festgelegten Sequenz ermöglicht, erhält man lineare Oligonucleotide, die auf biologischem Wege zirkularisiert (cyclisiert) werden können durch Verwendung von Ligations-Enzymen. Um Ligasen zum Schließen der Oligonucleotide mit

sich selbst verwenden zu können, müssen die Oligonucleotide eine terminale 5'-P-Gruppe tragen, sodass die Phosphorylierung der terminalen 5'-Gruppe auf chemischem Wege oder auch auf biologischem Wege erzielt werden kann durch Verwendung einer Kinase (vorzugsweise der Polynucleotidkinase) und von ATP oder irgendeines anderen Phosphatdonors. Nachstehend werden verschiedene Verfahren beschrieben, die geeignet sind, um die Zirkularisierung (Cyclisierung) von linearen Oligonucleotiden in vorteilhafter Weise durchzuführen.

1.1 Ein lineares Oligonucleotid kann zirkularisiert (cyclisiert) werden durch Herstellung einer partiell doppelsträngig gepaarten Struktur, um das Funktionieren einer Ligase, wie der T4-Ligase, mittels eines zweiten kürzeren Oligonucleotids als das vorhergehende und mit einer Sequenz, die komplementär zu den beiden Enden des ersten Oligonucleotids ist, zu erlauben. In diesem Falle, der in **Fig. 6** erläutert ist, dient das zweite kleine Oligonucleotid als Adapter und erlaubt das Aneinanderfügen der Enden der beiden terminalen Nucleotide des zu cyclisierenden Oligonucleotids. Die Wirkung der T4-Ligase oder irgendeines anderen Ligations-Enzyms, das seine Wirkung gegenüber der DNA ausüben kann, erlaubt dann die Zirkularisierung (Cyclisierung) unter Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen diesen beiden Nucleotiden. Diese Ligation kann in Lösung erfolgen, wobei die beiden Oligonucleotide, die in einem Medium miteinander vermischt werden, die Hybridisierung und die Ligation unter Konzentrations- und Temperatur-Bedingungen erlauben, die geeignet sind, um die intracatenäre Zirkularisierung (Cyclisierung) zu fördern und die Ligation zwischen den Oligonucleotiden, welche die Ausbeute der oben genannten Cyclisierungs-Reaktion vermindern kann, zu verhindern.

1.2 Eine Variante des vorstehend unter (1) beschriebenen Verfahrens besteht darin, die Cyclisierung des Oligonucleotids immer durch Verwendung eines Adapters durchzuführen, jedoch unter Verwendung eines auf einem Träger fixierten Oligonucleotids, der beispielsweise Nitrocellulose oder ein Derivat davon, eine Nylonmembran, einen Glasträger, eine Polysaccharid-Struktur oder irgendein anderer Träger sein kann, der die Fixierung eines Fragmentes einer Nucleinsäure auf kovalente oder nicht-kovalente Weise und schließlich die Hybridisierung zwischen diesem Fragment und einem Oligonucleotid erlaubt, und mit der Wirkung einer Ligase kompatibel ist. Dieses Verfahren besteht darin, dass man das Adapter-Oligonucleotid an einem Träger fixiert entweder mittels einer kovalenten Bindung oder mittels nicht-kovalenter Bindungen. Auf vorteilhafte Weise verwendet man kovalente Bindungen, welche die Durchführung einer großen Anzahl von Hybridisierungs/Ligations-Zyklen mit dem zu zylisierenden Oligonucleotid erlauben. Das Adapter-Oligonucleotid kann an seinem Träger fixiert werden entweder im Bereich eines terminalen Nucleotids, direkt oder mittels eines Kupplungsmittels, oder durch ein Nucleotid, das in einer inneren Position angeordnet ist und eine reaktive Gruppe trägt. Das Grundschema eines solchen Verfahrens ist in der **Fig. 6** erläutert. Der Vorteil der Fixierung des Adapter-Oligonucleotids ist ein doppelter: einerseits erlaubt diese Fixierung, die unter physikalisch kontrollierten Bedingungen durchgeführt wird (Anzahl der pro Einheit der Oberfläche fixierten Moleküle), die Verringerung des Auftretens der Bildung von Concatemeren bei der Hybridisierungs-Reaktion als Folge der Bindung zwischen den Oligonucleotiden und andererseits erleichtert sie die Herstellung von Ligations-Reaktoren durch Verwendung einer großen Anzahl von Adapter-Oligonucleotiden für mehrere Zirkularisierungs- bzw. Cyclisierungs-Zyklen.

1.3 Die Oligonucleotide können cyclisiert (zirkularisiert) werden, indem man absichtlich eingeführte sekundäre Strukturen sich zunutze macht, indem man Sequenzen vorsieht, die sich um sich selbst umfalten können unter Bildung von partiell doppelsträngigen Strukturen. Beispielsweise erläutert die **Fig. 6** den Fall eines "hantelförmigen" Oligonucleotids, das einen linearen Abschnitt aufweist, der eine Schleife (Spange) bildet, und die Sequenz vom antisense-Typ umfasst, eine doppelsträngige Region mit einer Länge von 9 Basenpaaren, und ein Schließ-Sequenz, die aus T_5 besteht. Diese Struktur ist in der Lage, Selbstpaarungen durchzuführen, die somit ein Molekül ergeben, das als Substrat für ein Ligations-Enzym, wie die T4-Ligase, verwendet werden kann. In diesem Fall hängt die Ligations-Ausbeute unter anderem von der Stabilität der Paarbildung im Bereich der doppelsträngigen Struktur ab. Mehrere Paarungs-Sequenzen wurden zum Gegenstand von Vergleichs-Untersuchungen gemacht und eine der Sequenzen, die eine vorteilhafte Cyclisierungs-Ausbeute (in der Größenordnung von 75%) erlaubt, ist in der **Fig. 6** angegeben. Obgleich es nicht wichtig ist, welches der Nucleotide zur Herstellung einer Schließschleife mit einer variablen Länge verwendet werden können, verwendet man vorzugsweise 4 bis 8 Reste und hauptsächlich entweder A oder T. Die doppelsträngige Paarbildungs-Region kann entweder eine Sequenz, die allein für die Bildung der Hantel-Struktur ausgenutzt wird, oder eine Sequenz, die zum Teil der Target-Region entspricht und durch eine intermolekulare Hybridisierung potentiell verschiebbar ist, umfassen.

Die Versuchsbedingungen, welche die wirksame Cyclisierung des Oligonucleotids erlauben, dessen Sequenz in der **Fig. 6** angegeben ist, sind weiter unten in dem experimentellen Abschnitt genau angegeben (vgl. "Eigenschaften und Vorteile der geschlossenen Oligonucleotide"). Im Falle dieser Sequenz liegt die Cyclisierungs-Ausbeute in der Größenordnung von 75%. Dieses Verfahren wurde angewendet, um die zirkulären Oligonucleotide herzustellen, von denen in dem experimentellen Teil die Rede ist.

1.4 Die zirkulären (kreisförmigen) Oligonucleotide können auch hergestellt werden durch eine doppelsträngige Struktur, die an jedem Ende mit sich selbst geschlossen wird durch eine kurze Schleife (Spange) aus

einer Nucleotid-Verbindungsstelle. Diese Oligonucleotide können für Verfahren vom sense-Typ verwendet werden, wie sie weiter oben beschrieben sind. Ein typisches Beispiel für ein sense-Oligonucleotid ist in der **Fig. 6** erläutert. Dieses Oligonucleotid umfasst eine gepaarte Sequenz von 24 Nucleotiden und zwei Verbindungsschleifen, die durch T₅ gebildet werden. In den hier angegebenen Beispielen umfasst dieses zirkuläre Oligonucleotid eine doppelsträngige Struktur, die der Erkennungs-Sequenz des hepatocytären Transskriptions-Faktors HNF-1 entspricht. Ein solches Oligonucleotid kann einfach cyclisiert werden, indem man sich die doppelsträngig sekundäre Struktur zunutze macht, die von den komplementären Sequenzen gebildet wird. Der Schließpunkt (d. h. die Enden) des Oligonucleotids werden so gewählt, dass die beste Wirksamkeit der Cyclisierung der intramolekulare Umfaltung erzielbar ist. Dieser Punkt kann zentral oder mehr oder minder distal sein in bezug auf die Mittellinie der zentralen sekundären Struktur. Es sei auch darauf hingewiesen, dass solche Oligonucleotide synthetisiert werden können, ausgehend nicht von einer intramolekularen Reaktion, sondern von einer intermolekularen Reaktion unter Verwendung von zwei um sich selbst umgefalteten linearen Oligonucleotiden, die eine partielle doppelsträngig Struktur aufweisen und kohäsive Enden bilden, die sich untereinander paaren können (vgl. das Schema in der **Fig. 6**).

1.5 Um zum Cyclisieren von Oligonucleotiden verwendet werden zu können, müssen sie eine doppelsträngige zentrale Region aufweisen, wobei ein Verfahren darin besteht, zwei komplementäre Oligonucleotide, ein langes und ein kurzes, herzustellen, wobei das zweite sich in dem zentralen Abschnitt mit dem ersten hybridisiert. Unter der Einwirkung der Ligase T4 ist es möglich, die beiden Enden der langen Oligonucleotide mit den Enden des gepaarten Oligonucleotids zu verbinden, selbst wenn keine Sequenz-Homologien vorliegen, welche die Ausbildung einer Selbstpaarung im Bereich der distalen 3'- und 5'-Sequenzen erlauben. Ein solcher Mechanismus führt zur Bildung einer geschlossenen zirkulären Oligonucleotid-Struktur, die einen zentralen doppelsträngigen Abschnitt aufweist.

1.6 Zur Herstellung von zirkulären Oligonucleotiden der Ribo-Reihe (Oligoribonucleotide) aus linearen Oligoribonucleotiden können die gleichen Verfahren in der gleichen Anordnung wie vorstehend beschrieben angewendet werden. Es ist aber auch möglich, ein Enzym zu verwenden, die RNA-Ligase T4, die in der Lage ist, spontan Cyclisierungen von Oligonucleotiden der Ribo- oder Desoxyribo-Reihe zu bewirken. Dieses Enzym erlaubt in Gegenwart von ATP lineare Oligonucleotide zu schließen und sie in zirkuläre (cyclische) Oligonucleotide umzuwandeln. Es ist somit möglich, ohne spezielle Matrix und in Abwesenheit irgendeines Adapter-Oligonucleotids, auf diese Weise Oligoribonucleotide zu cyclisieren (zirkularisieren). Das gleiche Enzym erlaubt auch die Cyclisierung von Oligodesoxyribonucleotiden, jedoch mit einer viel weniger hohen Wirksamkeit als wenn es sich dabei um Oligoribonucleotide handelt. Die RNA-T4-Ligase wird zweckmäßig verwendet, um antisense-Oligonucleotide zu cyclisieren, die eine Ribozym-Aktivität aufweisen, oder auch um "sense"-RNAs zu cyclisieren, wie beispielsweise die Wechselwirkungs-Sequenzen mit Transaktivatoren vom Typ tat von HIV.

1.7 Bei den vorstehend beschriebenen Verfahren lässt man immer Ligations-Enzyme einwirken zur Bildung von Phosphodiester-Bindungen und zum Verschließen der linearen Moleküle. Sie können zum Cyclisieren von Oligonucleotiden verwendet werden mit dem Ziel, sie gegen die Einwirkung von Nucleaseen beständig (resistant) zu machen, wobei im Rahmen der hier beschriebenen Erfindung jedes Enzym die Ausbildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen zwei Nucleotid-Resten erlaubt, wenn es sich dabei um DNA-Ligasen oder RNA-Ligasen handelt. Insbesondere können mit Vorteil thermostabile Enzyme verwendet werden, die aus wärmebeständigen Organismen stammen, welche die Durchführung von aufeinanderfolgenden Ligations/Denaturierungs/Hybridisierungs-Zyklen erlauben. Sie können verwendet werden zur Herstellung der zirkulären (kreisförmigen) Molekül, die den Gegenstand der Erfindung bilden, entweder mit Ligations-Enzymen in Lösung oder mit Enzymen, die auf einem Träger fixiert sind, mit dem Ziel, die Ausbeute der Reaktion zu erhöhen und/oder die Kosten zu verringern.

[0068] Sie können auch verwendet werden zur Herstellung von zirkulären (kreisförmigen) Molekülen, die einen Gegenstand der Erfindung bilden, wobei jedes chemische Reagens eine chemische Ligation erlaubt. Beispielsweise und ohne dass die Erfindung darauf beschränkt ist, können Reagenzien verwendet werden, wie z. B. Carbodiimid und Bromcyan.

2. Andere chemische Wege zur Herstellung von zirkulären (cyclischen) und/oder geschlossenen Oligonucleotiden

[0069] Die Herstellung von geschlossenen Oligonucleotiden bei einer pharmakologischen Anwendung, sei es für Tierexperimente oder für die Herstellung von pharmazeutischen Verbindungen, wendet zweckmäßig chemische Verfahren an, welche die Herstellung der erforderlichen beträchtlichen Mengen erlauben. Es können mehrere Wege angewendet werden, insbesondere kann man entweder lineare Oligonucleotide auf üblichen Wegen synthetisieren, die man anschließend durch chemische Ligation oder durch eine Bindung schließt, bei der terminale Nucleotide verwendet werden, oder durch Synthese von Oligonucleotiden, die Gegenstand einer

direkten Cyclisierung in der letzten Stufe der chemischen Synthese sein können.

2.1 Chemische Synthese von cyclischen Oligonucleotiden

[0070] Es wurden bereits mehrere Verfahren zur Herstellung von cyclischen Oligonucleotiden beschrieben (Barbato et al., 1989, de Vroom et al., 1988). Diese Verfahren, die in flüssiger Phase oder auf einem Träger durchgeführt werden, erlauben die Herstellung von cyclischen kurzen Oligonucleotiden. Beispielsweise kann man ein Verfahren anwenden, das darin besteht, dass man einen ersten Nucleotid-Rest mittels einer exocyclischen Amingruppe fixiert. Ausgehend von einem solchen Träger kann das Zusammenfügen des Oligonucleotids an den beiden 3'- und 5'-Enden erfolgen, die geschützt und verfügbar sind. Die Cyclisierung wird durchgeführt, wenn einmal die Synthese beendet ist, indem man beispielsweise MSNT verwendet nach der Deblockierung der Schutzgruppen der beiden Enden.

[0071] Sie können verwendet werden zur Synthese von cyclischen Oligonucleotiden mit dem Ziel, antisense- oder sense-Moleküle herzustellen, die gegen Exonuclease beständig sein, wobei jedes Syntheseverfahren die Verlängerung einer Polynucleotid-Kette, ausgehend von den beiden 3'- und 5'-Enden, und die Wiedervereinigung dieser beiden Enden nach Abschluss der Verlängerung der gewählten Sequenz erlaubt. Es kann jedes beliebige Verfahren angewendet werden, das die chemische Vereinigung von zwei unabhängig voneinander synthetisierten linearen Oligonucleotiden erlaubt, und diese können anschließend wieder kombiniert werden zur Bildung einer geschlossenen Struktur mittels einer spezifischen chemischen Reaktion der Enden.

2.2 Schließen und Cyclisieren von linearen Oligonucleotiden

[0072] Es können verschiedene Verfahren zur Herstellung von linearen Oligonucleotiden angewendet werden zur Herstellung von geschlossenen Strukturen, die den Gegenstand der Erfindung bilden. In diesen Strukturen ist das eine oder das andere oder beide terminalen Nucleotide an einer Kupplungsbindung beteiligt. Abgesehen von den weiter oben beschriebenen strikt cyclischen Strukturen, die man entweder durch Ligation oder durch jede andere chemische Reaktion erhalten kann, können verschiedene andere geschlossene Strukturen, die bereits erwähnt worden sind, durch chemische Kupplung erhalten werden.

[0073] Dies ist der Fall insbesondere bei Lasso-Strukturen oder einem der terminalen Nucleotide – zweckmäßig dem 3'-terminalen Nucleotid – wird der 5'-Abschnitt des Oligonucleotids mit einem der Nucleotide gekuppelt. Solche Strukturen können erhalten werden unter Verwendung von modifizierten Nucleotiden, die mit anderen Abschnitten des Moleküls Brückenbindungen bilden können. Dies ist auch der Fall bei Ballon-Strukturen, in denen eine Brückenbindung mit jedem beliebigen Agens zwischen zwei oder mehr der beiden Nucleotide erzeugt werden kann, die in den terminalen Regionen des Oligonucleotids angeordnet sind, wobei diese Regionen gepaart sind mit einer geringen Anzahl von Nucleotiden, vorzugsweise 4 bis 10 Nucleotiden.

[0074] Dies ist auch der Fall bei Oligonucleotiden, die durch jede beliebige Gruppe, jedes Molekül oder jedes Makromolekül geschlossen werden können, das eine Kupplung der endständigen Nucleotide untereinander erlaubt oder eine Kupplung zwischen einem terminalen Nucleotid und einem internen Nucleotid erlaubt und wodurch die Wirksamkeit der Verbindung in bezug auf seine intrazelluläre antisense- oder sense-Wirkung gesteigert werden kann. Beispielsweise kann man zum Cyclisieren der Oligonucleotide von langen Polypeptiden z. B. 5 bis 100 Aminosäuren verwenden, wobei die Polypeptid-Verknüpfung eine ausreichende Masse aufweisen muss, um von zellulären Rezeptoren erkannt zu werden und um eine bessere Internalisierung oder eine bessere Adressierung zu ermöglichen.

IV. Anwendungsbeispiele

[0075] Die geschlossenen Oligonucleotide, insbesondere die cyclischen Oligonucleotide, die Gegenstand der hier beschriebenen Erfindung sind, können in allen Fällen verwendet werden, in denen es vorteilhaft, über ein Oligonucleotid zu verfügen, das eine erhöhte Beständigkeit (Resistenz) gegenüber Exonucleaseen, verglichen mit einem linearen Oligonucleotid, aufweist.

[0076] Die geschlossenen Oligonucleotide können insbesondere als antisense-Agentien oder als sense-Agentien verwendet werden, um auf spezifische Weise auf die Transkription oder die Translation von einem oder mehreren Proteinen einzuwirken, das (die) im Bereich der Expression moduliert werden soll (sollen) auf dem Gebiet der Forschung oder Therapie.

[0077] Die hier nachstehend angegebenen Anwendungen sind nur einige nicht erschöpfende Beispiele und in keinem Falle Beschränkungen der Situationen, in denen ein Verfahren vom antisense- oder sense-Typ angewendet werden kann und in denen die Verwendung von natürlichen Oligonucleotiden, die gegenüber Exonucleaseen beständig (resistant) sind und eine stärker verminderte Toxizität aufweisen, einen Vorteil bietet.

[0078] Insbesondere sind die erfindungsgemäßen Verbindungen verwendbar als therapeutisches Agens, speziell als antivirales oder Antikrebs-Agens, insbesondere in pharmazeutischen Zusammensetzungen für die

äußere topische Verwendung oder für die systemische Verwendung.

[0079] Sie können aber auch Induktoren für natürliche Immunomodulatoren, wie z. B. Interferon, sein. Es ist auch möglich, sie in der in vitro- oder in vivo-Diagnostik zu verwenden.

[0080] Allgemein können die geschlossenen Oligonucleotide, die natürlichen und insbesondere die cyclischen, auf speziellen Gebieten verwendet werden, die besonders geeignet sind für das Gebiet der Dermatologie wegen der Zugänglichkeit der zu behandelnden Targets (Ziele) und wegen der geringeren oder nicht vorhandenen Toxizität dieser Verbindungen. Alle dermatologischen Erkrankungen, bei denen ein genetischer Dysfunktions-Mechanismus auftreten kann, für die ein ethiologischer Faktor identifiziert werden kann, um die Gen-Sequenz und/oder die messenger-RNA zu erkennen, erlauben die potentielle Anwendung eines antisense-Verfahrens oder sogar eines "sense"-Verfahrens in bestimmten günstigen Fällen.

[0081] Die Verwendung von natürlichen Oligonucleotiden, welche die stark reduzierte Toxizität aufweisen, erlaubt die Anwendung dieses Verfahrens-Typs für schwere oder leichtere Erkrankungen und auch gegebenenfalls für Anwendungen vom kosmetologischen Typ, d. h. auf einer gesunden Haut und bei einem Anwendungsbereich, bei dem die Toxizitäten der Produkte so niedrig wie möglich sein müssen.

[0082] Abgesehen von viralen Targets (Zielen}, die weiter unten definiert werden, können zahlreiche dermatologische Erkrankungen mit cyclischen oder geschlossenen natürlichen Oligonucleotiden, die gegenüber Exonucleasen beständig sind, behandelt werden. Unter den potentiellen Zielen für solche Verfahren sind zu nennen die Entzündungs-Erkrankungen, wie z. B. die atopischen Dermatitiden oder der Lupus erythematosus, die Keratinisierungs-Erkrankungen wie die Ichthyose und die Psoriasis und die Tumor-Erkrankungen, wie das Melanom oder das Haut-Lymphom T. So können beispielsweise cyclische antisense-Oligonucleotide in der Dermatologie verwendet werden, die gegen die messenger-RNA von Entzündungsmediatoren wie Interleukinen, gegen die messenger-RNA von Proteinen, die an dem Proliferationsstörungen der Epidermis-Zellen beteiligt sind, oder auch gegen messenger-RNA, die für Proteine codieren, die gegebenenfalls an der phänotypischen Hautalterung beteiligt sind, wie z. B. die Collagenase, die Elastase, die Transglutaminasen, gerichtet sein können.

[0083] Ganz allgemein können die geschlossenen, natürlichen und hauptsächlich cyclischen Oligonucleotide beispielsweise verwendet werden als antivirale Agentien, als antisense- oder sense-Agentien, sei es für topische (dermatologische) Indikationen oder für systemische Indikationen. Beispielsweise können solche Oligonucleotide als Antiherpes-Agentien (HSV-1 und HSV-2, CMV, EBV), als Antipapillomavirus-Agentien (Haut-HPV, Genitalien-HPV, Laryngien und andere), als Antihepatitis-Agentien (HBV, HCV, HDV), als Anti-HIV-Agentien (HIV-1 und HIV-2), als Anti-HTLV-Agens (HTLV-1 oder HTLV-2) und dgl. verwendet werden.

[0084] Diese cyclischen Oligonucleotide können auch verwendet werden als Agentien zur Unterdrückung der Expression von bestimmten zellulären Proteine, die direkt verantwortlich sind oder beteiligt sind an der Ethiologie von Proliferations-Erkrankungen und zellulären Differenzierungs-Erkrankungen. Beispielsweise können diese cyclischen Oligonucleotide gegen die Expression von onkogenen, zellulären Hyperexprimaten oder Exprimaten unkontrollierter Art bei bestimmten Tumorzellen (RAS, ERB, NEU, SIS, MYC, MYB und dgl.) gerichtet sein.

[0085] Insbesondere können diese natürlichen, gegen Exonuclease-Seren beständigen cyclischen Oligonucleotide verwendet werden als antisense-Agens, das gegen messenger-RNA von Onkogenen gerichtet ist, die in Leukämizellen exprimiert werden und an ihrer Proliferation beteiligt sind, oder auch als "sense"-Agentien, die gegen Proteine mit einer Affinität für bestimmte DNA-Sequenzen gerichtet sind und exprimiert werden in pathologischen Bereichen bei bestimmten Proliferations-Erkrankungen. Im Rahmen der Behandlung bestimmter Leukämien für Knochenmarktransplantationen können die geschlossenen cyclischen Oligonucleotide im Rahmen der "ex vivo"-Anwendung eingesetzt werden.

[0086] Für diese zahlreichen Indikationen können geeignete galenische Formulierungen hergestellt werden, um die Abgabe dieser Molekül an ihre Target-Zellen zu optimieren. So können beispielsweise geschlossene, insbesondere cyclische Oligonucleotide in Liposome, Nanoteilchen, LDL-Teilchen oder in jeden anderen Typ einer Mikrokugel, die eine ausreichende Konservierung erlaubt und die zielgerichtete Anwendung fördert, eingekapselt werden. Die geschlossenen, beispielsweise cyclischen Oligonucleotid-Moleküle können auch mit kationischen Tensiden kombiniert werden. Es ist klar, dass diese wenigen Beispiele weder erschöpfend noch die Erfindung beschränkend sind.

[0087] Die geschlossenen, insbesondere cyclischen Oligonucleotide, die Gegenstand der hier beschriebenen Erfindung sind, können somit in alle Arten von pharmazeutischen Präparaten in variablen Konzentrationen, je nach Indikationen, eingearbeitet werden.

[0088] Insbesondere erfordern die weiter oben angegebenen dermatologischen Anwendungen die Herstellung von Cremes, Lösungen, Emulsionen, Lotions, Gelen, Sprays, Pudern, Aerosolen und dgl., die in Assoziation mit cyclischen – oder geschlossenen – Oligonucleotiden mit einer ausgewählten Sequenz hergestellt werden, wobei übliche pharmazeutische Komponenten der Zusammensetzung dieser Produkte einverleibt werden. Beispielsweise können zur Herstellung von Präparaten, die für topische Anwendungen in der Dermatologie bestimmt sind, die cyclischen oder geschlossenen Oligonucleotide mit allen Arten von Konservierungs-

mitteln, wie z. B. Methyl- oder Propylhydroxybenzoat, z. B. Benzalkoniumchlorid und mit anderen Stabilisierungs-, Emulgierungs-, Dispergierungs-, Suspendierungs-, Solubilisierungs-, Färbe-, Verdickungs-Mitteln, Duftstoffen und dgl. kombiniert werden.

[0089] Es sei darauf hingewiesen, dass bestimmte dieser Zusammensetzungen, insbesondere die Zusammensetzungen, die für topische Anwendungen für Indikationen in der Dermatologie bestimmt sind, gleichzeitig mit cyclischen – oder geschlossenen – Oligonucleotiden sowie mit weiteren Wirkstoffen, wie z. B. bakteriostatischen Agentien oder antiseptischen oder antimikrobiellen oder antibiotischen oder analgetischen oder antipruritischen Agentien und dgl. kombiniert werden können Alle diese Beispiele sind nur Erläuterung angegeben und sind weder erschöpfend noch beschränken sie die Erfindung.

V. Eigenschaften und Vorteile der geschlossenen Oligonucleotide

[0090] Die Versuchsbeispiele sind nachstehend angegeben zur Erläuterung der Vorteile eines geschlossenen Oligonucleotids gegenüber einem "offenen" linearen Oligonucleotid mit der gleichen Sequenz. Diese Beispiele sind Versuchen entnommen, die mit Oligonucleotiden durchgeführt wurden, die nach dem in dem Abschnitt "1.3 Herstellung von geschlossenen Oligonucleotiden" angegebenen Verfahren cyclisiert worden sind. Die geschlossenen Oligonucleotide, von denen hier die Rede ist, sind somit cyclische Oligonucleotide, die aus natürlichen Oligonucleotiden bestehen, die durch nicht-modifizierte Phosphodiester-Bindungen miteinander verbunden worden sind.

[0091] Die Beschreibung und die Beispiele nehmen Bezug auf die beiliegenden Figuren, welche die folgenden Legenden tragen.

[0092] **Fig. 1:**

- A – Beispiele für Strukturen von geschlossenen antisense-Oligonucleotiden;
- B – Beispiele für Strukturen von geschlossenen sense-Oligonucleotiden;
- C – ein gemischtes Molekül, das einen sense- und antisense-Effekt ausüben kann;
- D – Basenstrukturen, die bestehen aus Oligonucleotiden und Struktur der Phosphodiester-Bindung, welche die natürlichen Nucleotide miteinander verbindet.

[0093] **Fig. 2:**

- A – schematische Darstellung bestimmter Modifikationen, die zur Erhöhung der Stabilität der Phosphodiester-Bindung und insbesondere ihrer Beständigkeit gegen Endonukleasen verwendet werden können;
- B – Darstellung einiger reaktiver Agentien vom Interkalations-Typ, die mit antisense-Oligonucleotiden gekoppelt werden können.

[0094] **Fig. 3:**

[0095] Beispiel für ein cyclisches Ribozym, das katalytische Stellen, so genannte "T-Stellen" und eine Spange (Schleife) aus RNA umfasst, die komplementär zu einer Target-Sequenz sein kann.

[0096] **Fig. 4:**

- A – schematische Darstellung eines cyclischen Oligonucleotids, bestehend aus natürlichen Nucleotiden, die durch nicht-modifizierte Phosphodiester-Bindungen miteinander verbunden sein können;
- B – schematische Darstellung eines geschlossenen Lasso-Nucleotids mit freiem 5'-Ende und blockiertem 3'-Ende in der intracatenaren Brückenbindung;
- C – schematische Darstellung eines geschlossenen Ballon-Oligonucleotids mit einer intracatenaren Bindung, die zwischen den vorletzten 5'- und 3'-terminalen Nucleotiden besteht. Dieser Struktur-Typ kann eine oder mehrere intercatenare Bindungen zwischen einem beliebigen der gepaarten Nucleotid-Paare aufweisen, die den Schwanz des Ballons bilden;
- D – schematische Darstellung eines durch ein Peptid (Oligopeptid) geschlossenen Oligonucleotids;
- E – schematische Darstellung eines cyclischen Oligonucleotids, das eine seitliche Peptid-Verlängerung aufweist.

[0097] **Fig. 5:**

- A – schematische Darstellung eines geschlossenen cyclischen Oligonucleotids, das eine partielle selbst ge-paarte bicatenare Region aufweist;
- B – schematische Darstellung eines geschlossenen cyclischen Oligonucleotids, das aus einer selbst ge-paarten doppelsträngigen langen Sequenz (Erkennungs-Sequenz beispielsweise eines Transkriptions-Faktors) und zwei Poly-Verbindungsspangen (T) besteht.

[0098] **Fig. 6:**

- A – Cyclisierung eines linearen Oligonucleotids unter Verwendung eines partiell komplementären Oligonucleotids als Führung und der Ligase T4;

B – Cyclisierung eines linearen Oligonucleotids unter Verwendung eines partiell komplementären Oligonucleotids als fixierte Führung auf einem Träger und der Ligase T4;
C – Cyclisierung eines Oligonucleotids, das eine Selbstpaarungs-Region umfasst, mit der Ligase T4;
D – Beispiel für eine bimolekulare Reaktion zwischen zwei selbst gepaarten Oligonucleotiden, die kohäsive Enden aufweisen, welche die Bildung eines Oligonucleotids erlauben, das eine lange doppelsträngige Region und zwei Adapter-Spangen umfasst.

[0099] **Fig. 7:**

A – Autoradiographie eines Polyacrylamidgels, auf dem man verschiedene (cyclische und lineare) Oligonucleotide nach der Behandlung mit verschiedenen exonukleolytischen Enzymen laufen lässt.

[0100] Die Sequenz des Oligonucleotides c7 ist diejenige, wie sie in der **Fig. 6C** beschrieben ist; die Oligonucleotide c6 und c8 bestehen aus verschiedenen Sequenzen, können jedoch den gleichen Struktur-Typ wie c7 annehmen, d. h. eine mit einem zentralen doppelsträngigen Abschnitt geschlossene Struktur.

[0101] Die Bedingungen der Ligation der Oligonucleotide c6, c7 und c8 sind diejenigen, wie sie in dem Abschnitt 1. "Eigenschaften und Vorteile der geschlossenen Oligonucleotide" beschrieben sind.

[0102] 1 µg des radioaktiven Oligonucleotids, das aus der Ligations-Reaktion stammte (Bahnen 5 bis 8) oder 1 µg eines entsprechenden linearen Oligonucleotids (Bahnen 1 bis 4) wurden auf Polyacrylamidgel 15%/7M Harnstoff ohne nachträgliche Behandlung analysiert (Bahnen 4 und 5) oder nach einer Inkubation mit alkalischer Phosphatase (Bahnen 3 und 6) mit Exonuclease VII (Bahnen 2 und 7) oder mit Phosphodiesterase 1 (Bahnen 1 und 8) unter den in dem Abschnitt "2. Eigenschaften und Vorteile der geschlossenen Oligonucleotide" analysiert;

L gibt die Wanderungsposition der linearen Oligonucleotide an; F gibt die Wanderungsposition der geschlossenen Oligonucleotide an;

B – Autoradiographie eines Polyacrylamidgels, auf dem man lineare oder cyclische Oligonucleotide nach einer Inkubation in Gegenwart von Serum laufen lässt.

[0103] 1 µm des radioaktiven Oligonucleotids c7 (dessen Sequenz in der **Fig. 6C** angegeben ist), linear (L) oder geschlossen (F), wurden hergestellt und gereinigt wie in dem Abschnitt "1. Eigenschaften und Vorteile der geschlossenen Oligonucleotide" beschrieben. Nach der Inkubation bei 37°C für die angegebenen Zeitspannen in Gegenwart von DMEM, enthaltend 10% fetales Kälberserum, wurden die Produkte auf Polyacrylamidgel 15%/7M Harnstoff unter den im Abschnitt "3. Eigenschaften und Vorteile der geschlossenen Oligonucleotide" analysiert.

[0104] C- (graphische Darstellung des Abbaus (bestimmt durch Analyse auf einem Gel wie vorstehend beschriebenen) der Oligonucleotide c7L (linear) und c7F (cyclisch) nach Inkubation in 10% fetalem Kalbsserum, wie vorstehend beschrieben, zum Zeitpunkt t = 0 bis zum Zeitpunkt t = 96 h. Zur Erzielung einer quantitativen Bestimmung wurden die Gelfragmente, die den Stellen auf den Banden entsprachen, die durch Audioradiographie ermittelt wurden, herausgeschnitten und ihre Radioaktivität wurde durch Auszählen in einem Szintillationszähler bestimmt. Die Ergebnisse sind in % Abbau, bezogen auf die Radioaktivität zum Zeitpunkt t = 0, angegeben.

[0105] **Fig. 8:**

A – Autoradiographie eines nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels, auf dem man lineare oder cyclische Oligonucleotide nach Hybridisierung mit Oligonucleotiden, die komplementäre Sequenzen aufweisen, der Desoxyribo- oder Ribo-Reihe laufen lässt.

300 ng des geschlossenen radioaktiven Oligonucleotids c7 (F) oder 160 ng des linearen Oligonucleotids c7 (L) wurden mit steigenden Mengen eines nicht-komplementären Oligonucleotids (Bahnen a bis g) oder eines 42-mer-Oligonucleotids (12; Bahnen h bis n), die komplementär zu 21 Nucleotiden der großen Spange von c7 entsprechen (**Fig. 6C**), inkubiert. Die in kaltem Zustand zugegebene Menge an Oligonucleotid beträgt 0 (Bahnen a und h), 30 ng (b und i), 60 ng (c und j), 150 ng (d und k), 300 ng (e und l), 750 ng (f und m) oder 1500 ng (g und n). Nach der Hybridisierung unter den in dem obigen Abschnitt "4.1 Eigenschaften und Vorteile der geschlossenen Oligonucleotide" beschriebenen Bedingungen wurden die Produkte auf einem nicht-denaturierenden 20% Polyacrylamidgel analysiert. Die Pfeile zeigen die Positionen der geschlossenen (F), linearen (L) Oligonucleotide c7 und der Hybride c7L/12 und c7F/12 an.

B – Autoradiographie eines denaturierenden Polyacrylamidgels, auf dem man hybridisierte oder nicht-hybridisierte lineare oder cyclische Oligonucleotide laufen lässt, die eine komplementäre Reaktion umfassen, die anschließend mit der Nuclease S1 behandelt wurden.

300 ng des geschlossenen (F) oder linearen (L) Oligonucleotids c7, die wie in der **Fig. 8A** beschrieben hergestellt und gereinigt wurden, oder 300 ng eines kalten 42-mer Oligonucleotids (12) wurden mit 1 ng einer langen RNA von 43-Nucleotiden, die in vitro transkribiert und mit ³²P mit einer hohen spezifischen Aktivität markiert worden waren (Abschnitt "4.3 Eigenschaften und Vorteile der geschlossenen Oligonucleotide") in-

kubiert. Die 43-mer-RNA umfasst 27 komplementäre Basen der 21 Nucleotide des großen Bügels (Schleife) + 6 Nucleotide der selbstgepaarten Region von c7F (**Fig. 6C**); sie ist auch komplementär zu 37 Basen des 42-mer-Oligonucleotids 12. Nach der Hybridisierung werden die Produkte auf einem Polyacrylamidgel 20 %/7M Harnstoff direkt (Bahn 1) oder nach 3-minütiger Inkubation (Bahn 3) oder nach 30-minütiger Inkubation (Bahn 4) in Gegenwart der Nuclease S1 oder nach 30 min in Abwesenheit der Nuclease S1 (Bahn 2) unter den in dem Abschnitt "4.2 Eigenschaften und Vorteile der geschlossenen Oligonucleotide" analysiert. Der linke Teil der Figur (-) zeigt die Ergebnisse, die mit nur inkubiertem 43-mer RNA erhalten wurden. Bahn 5: 43-mer RNA, die keiner Behandlung nach der Transkription unterzogen worden ist; die Pfeile geben die Positionen der 43-mer RNA-Oligonucleotide c7 geschlossen (F), c7 linear (L), sowie diejenigen der geschützten RNA (RNA 37, 27 und 21) an.
C – Autoradiographie eines denaturierenden Polyacrylamidgels, auf dem man lineare oder cyclische Oligonucleotide, die mit Oligoribonucleotiden hybridisiert worden sind oder nicht, die eine komplementäre Region aufweisen und die man anschließend mit RNase H behandelt hat, laufen (wandern) lässt.

[0106] Die getesteten Oligonucleotide (RNA 43, c7F, c7L und 12) sowie die Hybridisierungs-Bedingungen sind die gleichen wie in der **Fig. 8B** beschrieben. Nach der Hybridisierung wurden die Reaktionsprodukte in Abwesenheit (-) oder in Gegenwart (+) der RNase H inkubiert und auf einem Polyacrylamidgel 20%/7M Harnstoff unter den in dem obigen Abschnitt "5. Eigenschaften und Vorteile der geschlossenen Oligonucleotide" analysiert. Die Pfeile zeigen die Positionen des 43-mer RNA, von c7 geschlossen (F) oder c7 linear (L) an.

[0107] **Fig. 9:** Analyse der Effekte von linearen oder cyclischen Oligonucleotiden auf das Zellenwachstum.

[0108] **Fig. 10:** Untersuchung der Inhibitor-Effekte von linearen oder cyclischen antisense-Oligonucleotiden auf die Verwendung des Virus HSV-1.

[0109] **Fig. 11:** Verzögerungsgel, das die Fixierung des Transkriptions-Faktors HNF-1 durch lineare doppelsträngige oder geschlossene cyclische Oligonucleotide vom sense-Typ erläutert. Die verwendeten Abkürzungen in dieser Legende beziehen sich auf die in Beispiel 7 angewendete Nomenklatur.

- 01 HNF-1 LB ohne nuclearen Extrakt
- 02 HNF-1 LB +1 µg nuclearen Leberextrakt
- 03 HNF-1 C1 ohne nuclearen Extrakt
- 04 HNF-1 C1 +1 µg nuclearen Leberextrakt
- 05 HNF-1 C1 nicht gebunden, ohne nuclearen Extrakt
- 06 HNF-1 C1 nicht ligiert +1 µg nuclearen Leberextrakt
- 07 HNF-1 C2 ohne nuclearen Extrakt
- 08 HNF-1 C2 + 1 µg nuclearen Leberextrakt
- 09 HNF-1 C2 nicht ligiert, ohne nuclearen Extrakt
- 10 HNF-1 C2 nicht ligiert + 1 µg nuclearen Leberextrakt
- 11 HNF-1 C3 ohne nuclearen Extrakt
- 12 HNF-1 C3 + 1 µg nuclearen Leberextrakt
- 13 HNF-1 C3 nicht ligiert, ohne nuclearen Extrakt
- 14 HNF-1 C3 nicht ligiert, + 1 µg nuclearen Leberextrakt

[0110] HNF-1C1, C2, C3 stellen 3 verschiedene sense-Oligonucleotid-Präparate HNF-1 C dar.

Beispiel 1

Herstellung von geschlossenen Oligonucleotiden die eine Selbstpaarungs-Region aufweisen, mit der DNA-Ligase T4

[0111] Die Versuchs-Bedingungen, die das wirksame Schließen/Ligieren der Oligonucleotide erlauben, deren Sequenzen in der **Fig. 7A** angegeben sind, sind die folgenden: 11 µM eines linearen Oligonucleotids, das in 5'-Stellung mit g ³²P ATP markiert worden ist (150 µg; spezifische Aktivität = 2–3 × 10⁵ cpm/µg), 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM BSA auf M ATP und 10 000 Einheiten der DNA-Ligase T4 (2 000 u/µl; New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Nach 48-stündiger Inkubation bei 4°C werden die Reaktionsmischungen mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, mit absolutem Ethanol ausgefällt, mit 80%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Produkte der Ligation werden anschließend von dem nicht-ligierten Oligonucleotid durch denaturierende Elektrophorese in Polyacrylamidgel 20%/7M Harnstoff abgetrennt. Die Positionen der Oligonucleotide können direkt durch Interferenz der Fluoreszenzstrahlung bei 212 nm beobachtet werden, wobei das Gel auf eine Platte aufgebracht ist, die einen ultraviolet fluoreszierenden Chromophor enthält, oder auch durch Autoradiographie. Das ligierte monomere Oligonucleotid ist charakterisiert durch eine verlangsamte Wanderung, bezogen auf sein nicht ligiertes Homologes (**Fig. 7A** und B). Die Banden, die dem geschlossenen monomeren Oligonucleotid und seinem nicht-ligierten

linearen Homologen entsprechen, werden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA wird durch klassische Verfahren zur Extraktion von Polyacrylamidgelen isoliert. Im Falle der betrachteten Sequenzen liegt die Ausbeute der Bildung des geschlossenen monomeren Oligonucleotids in der Größenordnung von 65 bis 75%.

[0112] Alternativ können die Produkte der Ligations-Reaktion ohne vorherige Reinigung direkt nach der Inaktivierung der DNA-Ligase durch Erwärmung des Ligations-Mediums für 2 min auf 90°C analysiert werden.

Beispiel 2

Beständigkeit (Resistenz) der cyclischen Oligonucleotide der Desoxyribo-Reihe gegenüber Nucleaseen und gegenüber Phosphatasen

[0113] Die Beständigkeit der cyclischen und linearen Oligonucleotide gegenüber der Wirkung von alkalischer Phosphatase (Phosphomonoesterase, welche die 3'- und 5'-Phosphate der DNA und der RNA hydrolysiert) und der Exonuclease VII (eine Exodesoxyribonuclease, die einzelsträngige DNA ab den beiden 3'- und 5'-Enden digeriert) und der Phosphodiesterase 1 (eine Exonuclease, welche die DNA oder die RNA ab dem 3'-OH-Ende digeriert) wurde verglichen. Für diesen Versuch wurden die 5'-Oligonucleotide ^{32}P , deren Sequenzen in der **Fig. 7A** angegeben sind, wie vorstehend beschrieben hergestellt (Par. 1). Nach der Ligation wurden die Reaktionsmischungen 2 min lang auf 90°C erwärmt, um die DNA-Ligase zu inaktivieren.

[0114] 1 µg Oligonucleotid, das aus der Ligationsreaktion stammte, oder 1 µg lineares homologes, nicht-cyclisiertes Oligonucleotid, das als Vergleichsmaterial verwendet wurde, wurden bei 37°C in einem Volumen von 10 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT in Gegenwart einer Einheit einer Kalbsintestinal-Phosphatase (CIP) oder einer Einheit einer Exonuclease VII von E.coli 1 h lang oder in Gegenwart von 5×10^{-5} Einheiten Phosphodiesterase 1 von Crotalus durissus 10 min lang inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsprodukte auf 15%igem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen analysiert. Das Ergebnis des Gels ist in der **Fig. 7A** dargestellt. Man stellt auf der Autoradiographie dieses Gels fest, dass:

- die geschlossenen cyclischen Oligonucleotide gegen die Phosphatase sind, während die linearen Oligonucleotide ihr gegenüber empfindlich sind;
- die geschlossenen cyclischen Oligonucleotide beständig gegenüber der Wirkung von Exonuclease VII sind, während die linearen Oligonucleotide gegenüber dieser empfindlich sind;
- die geschlossenen cyclischen Oligonucleotide beständig gegenüber der Wirkung der Phosphodiesterase 1 beständig sind, während die linearen Oligonucleotide ihr gegenüber empfindlich sind.

[0115] Dieser Versuch zeigt, dass die wie weiter oben angegeben herstellten Oligonucleotide cyclische Moleküle sind, die auf kovalente Weise geschlossen worden sind und dass diese Moleküle eine vollständige Beständigkeit gegenüber exonucleolytischen Enzymen aufweisen.

Beispiel 3

Beständigkeit von geschlossenen cyclischen Oligonucleotiden gegenüber Serum-Nucleaseen

[0116] Die cyclischen geschlossenen Oligonucleotide weisen eine Beständigkeit gegen nucleolytischen Abbau auf, die höher ist als diejenige der linearen Oligonucleotide, wenn sie in Gegenwart des Serums inkubiert worden sind.

[0117] 1 µg geschlossenes Oligonucleotid und 1 µg des entsprechenden linearen Oligonucleotids, die hergestellt und nach der Ligation gereinigt worden sind wie in Paragraph 1 beschrieben, werden bei 37°C in 10 µl DMEM-Medium, das 10% fetales Kalbsserum enthält, inkubiert. Die Kinetik der Reaktion wird bis zu 96 h lang verfolgt und die als Funktion der Zeit entnommenen Proben werden auf 15%igem Polyacrylamidgel analysiert unter denaturierenden Bedingungen. Die Autoradiographie eines Analysengels des Abbaus nach 24 h ist in der **Fig. 7B** dargestellt.

[0118] Die **Fig. 7C** zeigt die graphische Darstellung einer Untersuchung nach 96-stündigem Abbau eines linearen Oligonucleotids (c7L) im Vergleich zu dem Abbau eines cyclischen Oligonucleotids (c7F) unter den oben beschriebenen Bedingungen.

[0119] Diese Grafik zeigt die beträchtlichen Unterschiede in bezug auf die Stabilitäten zwischen diesen beiden Oligonucleotid-Typen.

[0120] Diese Versuche erlauben das Ziehen der folgenden Schlussfolgerungen:

- die linearen Oligonucleotide werden durch die Nucleaseen des Serums schnell abgebaut. Der Abbau beginnt ab den ersten Minuten der Inkubation und ist nach einigen Stunden beendet;
- die Halbwertszeit eines normalen nicht-modifizierten linearen Oligonucleotids ist sehr viel kleiner als 1 h, wobei diese Lebensdauer je nach den verwendeten Seren mehr oder minder leicht variieren kann;
- der Abbau der linearen Oligonucleotide erfolgt allmählich und man beobachtet das Auftreten von Abbau-

produkten mit abnehmender Länge, die als Funktion der Zeit immer kürzer werden, was anzeigt, dass der Abbau hauptsächlich das Werk der Exonucleasen ist und insbesondere der 3'-Exonuclease;
– dagegen sind die geschlossenen Oligonucleotide gegenüber der Nucleolyse durch die Serumenzyme beständig und es ist eine Umwandlung von weniger als 60% in Abbauprodukte nach 96-stündiger (4-tägiger) Inkubation bei 37°C festzustellen;
– die Halbwertszeit eines geschlossenen cyclischen Oligonucleotids in dem Serum beträgt sehr viel mehr als 24 h.

[0121] Diese Ergebnisse bestätigen, dass der Abbau der antisense-Oligonucleotide in dem Serum hauptsächlich das Werk von Exonucleasen und nicht von Endonucleasen ist, und sie zeigen die Beständigkeit der geschlossenen Oligonucleotide gegen Abbau.

[0122] Natürliche geschlossene Oligonucleotide, die keine speziellen chemischen Modifikationen tragen, weisen eine Beständigkeit gegenüber Serum-Nucleasen auf, die ähnlich der Beständigkeit ist, wie sie für modifizierte Derivate beschrieben wurde. Dieser Versuch zeigt somit, dass unter den Standard-Bedingungen der Inkubation von Oligonucleotiden in Gegenwart von Serum die geschlossenen Oligonucleotide, die den Gegenstand dieses Patents darstellen, einen beträchtlichen Vorteil gegenüber den linearen Oligonucleotiden aufweisen.

Beispiel 4

Hybridisierung von geschlossenen Oligonucleotiden der Desoxyribo-Reihe mit DNA und RNA

[0123] Um einen antisense-Effekt zu zeigen, müssen die antisense-Oligonucleotide mit ihrem Target unter zufriedenstellenden Stabilitäts-Bedingungen hybridisieren können. Es wurde die Hybridisierung zwischen geschlossenen Oligonucleotiden Polynucleotiden, die komplementäre Sequenzen tragen, entweder der Ribonucleic Acid (RNA) oder der Desoxyribo-Reihe analysiert.

Beispiel 4-1

Nachweis der Hybridisierung zwischen einem geschlossenen Oligonucleotid und einer linearen DNA

[0124] Man inkubiert 300 ng eines geschlossenen cyclischen Oligonucleotids, das wie vorstehend beschrieben hergestellt und gereinigt worden ist – oder 160 ng eines linearen homologen Oligonucleotids als Vergleichsmaterial – mit einem kalten Oligomer mit einer Länge von 42 Nucleotiden, das eine Sequenz von 21 Nucleotiden umfasst, die komplementär zu den 21 Basen sind, welche die große Spange in der geschlossenen Struktur bilden (vgl. die Sequenz der **Fig. 6C**). Die Molverhältnisse zwischen dem markierten Oligonucleotid und dem kalten komplementären Oligonucleotid variieren von 10 : 1 bis 1 : 5. Die Hybridisierung erfolgt für 1 h bei 37°C in 1X SSC (150 mM NaCl, 15 mM Na₃-Citrat, pH 7,0). Nach der Inkubation werden die Produkte auf einem 20%igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert. Die Ergebnisse der Autoradiographie des Gels sind in der **Fig. 8A** dargestellt. Auf diesem Gel stellt man fest, dass die Verschiebungskinetiken der Banden zwischen den einzelsträngigen und doppelsträngigen Positionen für die linearen Oligonucleotide und die geschlossenen Oligonucleotide identisch sind. Dieses Ergebnis bedeutet, dass die Hybridisierungs-Wirkungsgrade zwischen einem geschlossenen Oligonucleotid und einer komplementären DNA identisch mit denjenigen eines linearen Oligonucleotids mit einer komplementären Sequenz sind.

Beispiele 4-2

Kartographie der Hybridisierung zwischen einem geschlossenen Oligonucleotid und einer linearen RNA

[0125] Der folgende Versuch besteht darin, nach der Schutzmethode mit der Nuclease S1 die Position der doppelsträngigen Regionen bei der Hybridisierung zwischen einem geschlossenen Desoxyribonucleotid und einem Oligoribonucleotid, das eine Sequenz aufweist, die komplementär zur Region in der Schleife des geschlossenen Oligonucleotids ist, zu analysieren. Die Nuclease S1 ist eine Endonuclease, die spezifisch für Einfachstrang-Nucleinsäuren ist, die nur die nicht gepaarten Sequenzen digeriert. Dies ist ein Enzym, das die Kartographie der Regionen erlaubt, die in doppelsträngiger Form vorliegen, und dass ihre Differenzierung von den einzelsträngigen Regionen erlaubt.

[0126] Man inkubiert ein geschlossenes Oligonucleotid, das wie weiter oben beschrieben synthetisiert und gereinigt worden ist, mit einer linearen RNA mit einer Länge von 43 Nucleotiden, die eine Sequenz von 27 Basen aufweist, die komplementär zu den 21 Nucleotiden der Spange der geschlossenen Oligonucleotide und zu 6 der beteiligten Nucleotide in der selbstgepaarten Region sind (vgl. die Sequenz der **Fig. 6C**). Diese RNA wur-

den durch RNA-Polymerase T7 transkribiert aus einer synthetischen Matrix und markiert mit einem ^{32}P ATP mit einer hohen spezifischen Aktivität ($2,3 \times 10^8 \text{ cpm}/\mu\text{g}$). Nach der Transkription wird die transkribierte RNA durch Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel 15%/7M Harnstoff gereinigt, aus dem Gel eluiert und mit Ethanol ausgefällt, dann in Wasser suspendiert.

[0127] Nach dem 1-stündigen Inkubieren bei 37°C von 300 ng eines geschlossenen Oligonucleotids oder seines linearen Homologen mit 1 ng RNA in 0,15 M NaCl, 0,1 M Hepes pH 7,9, 0,3 mM EDTA verdünnt man die Reaktionsmischung auf das 10-fache in 50 mM NaCl, 33 mM Natriumacetat pH 4,4 und 30 μM ZnSO₄ und man gibt 4 Einheiten der Nuclease S1 zu. Man entnimmt aliquote Anteile nach 3-minütiger und 30-minütiger Digestion bei 37°C und analysiert die erhaltenen Produkte auf 20%igem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen. Als Kontrolle inkubiert man außerdem unter identischen Bedingungen radioaktive RNA in Gegenwart eines linearen Oligonucleotids, das komplementär zu der RNA in bezug auf 37 Nucleotide ist. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der **Fig. 8B** dargestellt.

[0128] Man stellt auf diesem Gel fest, dass

- die in Abwesenheit eines komplementären Oligonucleotids oder in Gegenwart eines nicht komplementären Oligonucleotids inkubierte RNA tatsächlich nicht hybridisiert ist und durch die Nuclease S1 vollständig digeriert ist;
- die mit einem linearen Kontroll-Oligonucleotid inkubierte RNA gegen Digestion ge schützt ist über eine Länge von 37 Nucleotiden, dies entspricht der Länge der komplementären Sequenzen; nach 30-minütiger Inkubation verschiebt sich das Schutzprofil in Richtung auf zentrale Banden um zwei Hauptbanden von 35 bzw. 34 Nucleotiden herum, was einer "Respiration" des doppelsträngigen Moleküls entsprechen kann;
- die mit dem geschlossenen Oligonucleotide inkubierte RNA ein charakteristisches Schutzprofil aufweist mit mehreren Banden, die verteilt sind entsprechend einer um eine Bande mit einer Länge von 27 Nucleotiden zentrierten Verteilung, die der Hauptbande entspricht; nach 30-minütiger Inkubation befinden sich die geschützten Banden im Bereich von 20 und 21 Nucleotiden;
- das Schutzprofil, das bei der Inkubation der RNA mit einem Oligonucleotid mit der gleichen Sequenz wie das cyclische, Oligonucleotid, das jedoch linear ist, identisch ist mit demjenigen des cyclischen Oligonucleotids;
- das Schutzschema der RNA durch das geschlossene Oligonucleotid zeigt, dass die Hybridisierung zwischen RNA und dem cyclischen Bügel des Oligonucleotids über eine optimale Länge von 21 Nucleotiden erfolgt ist, die somit die Gesamtheit der Spange (der Schleife) umfasst. Die komplementäre RNA kann selbst die gepaarten Nucleotide in dem doppelsträngigen Abschnitt des Oligonucleotids verschieben, um sich dort zu hybridisieren.

[0129] Dieser Versuch zeigt, dass die Hybridisierung zwischen einem geschlossenen Oligonucleotid und einer RNA, die eine Region umfasst, die komplementär zu der Spange ist, unter Standard-Temperatur- und -Ionenkonzentrations-Bedingungen ablaufen kann und dass das so gebildete Hybrid die normalen Eigenschaften eines doppelsträngigen Moleküls aufweist, das gegen die Nuclease S1 beständig (resistant) ist.

Beispiel 5

Aktivierung der Aktivität von RNase H durch ein Hybrid das zwischen einem geschlossenen cyclischen Oligonucleotid und einer linearen RNA gebildet worden ist

[0130] Es ist bekannt, dass die antisense-Effekte von Oligonucleotiden, die komplementär zu einer messenger-RNA sind, in zahlreichen Fällen das Ergebnis der Einwirkung von zellulärer RNase H auf das so gebildete Substrat sind. Die RNase H ist eine enzymatische Aktivität, welche die RNA abbaut, wenn sie in Form eines RNA-DNA-Hybrids vorliegt. Es wurde bestätigt, dass die Hybridisierung zwischen einem geschlossenen antisense-Oligonucleotid und einer linearen RNA ein Substrat für die RNase H darstellt. Die Struktur der für diesen Versuch verwendeten linearen RNA sowie ihre Herstellung sind in den obigen Paragraphen beschrieben.

[0131] Die Hybridisierung von 300 ng eines geschlossenen Oligonucleotids und seines linearen Homologen mit 1 ng radioaktiver RNA ($2,3 \times 10^8 \text{ cpm}/\mu\text{g}$), die eine Region umfasst, die komplementär zu dem Teil des antisense-Oligonucleotids in dem Bügel ist, wird unter Bedingungen durchgeführt, wie sie in dem Paragraphen 4.2 beschrieben sind. Diese Bedingungen gewährleisten eine Hybridisierung der Gesamtheit der RNA mit der komplementären DNA. Man kann sagen, dass die Hybridisierungsreaktion durch die DNA "geföhrt" wird. Nach der Inkubation verdünnt man das Volumen auf das 10-fache, indem man den Inkubationspuffer auf 20 mM Tris HCl, pH 7,5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT einstellt, und man gibt 2 Einheiten RNase H zu. Man inkubiert 20 min lang bei 37°C und analysiert die Reaktionsprodukte wie oben angegeben. Die Ergebnisse des Gels sind in der **Fig. 8C** dargestellt. Man stellt fest, dass

- die mit einer komplementären DNA-Sequenz nicht hybridisierte markierte RNA gegenüber der Wirkung von RNase H vollständig resistent ist;

- die markierte RNA mit einer Länge von 43-Nucleotiden, die mit einem linearen Kontroll-Oligonucleotid, das zu 37 Basen der RNA komplementär ist, hybridisiert ist, gegenüber der Wirkung von RNase H teilweise empfindlich wird und Abbauprodukte ergibt;
- die markierte RNA, die mit einem geschlossenen Oligonucleotid hybridisiert ist, dessen Spange komplementär zu 21 Nucleotiden dieser RNA ist, gegenüber der Wirkung der RNase H sehr empfindlich wird und eine Reihe Abbauprodukten ergibt, deren Längen mit den Schutzanalysen gegenüber S1, wie sie in dem obigen Paragraphen angegeben sind, kompatibel sind.

[0132] Der Versuch zur Induktion eines Substrats für die RNase H ist nämlich das Spiegelbild zu dem Schutzversuch gegenüber S1 und die in beiden Fällen erhaltenen Ergebnisse sind vollständig kohärent, was hinweist auf ähnliche Hybridisierungspositionen und gleichzeitig zeigt, dass ein Substrat für die RNase H durch Hybridisierung zwischen einer linearen RNA und einem cyclischen Oligodesoxyribonucleotid erzeugt werden kann.

[0133] Dieser Versuch zeigt daher, dass eine lineare RNA, die teilweise mit einem geschlossenen Oligodesoxyribonucleotid hybridisiert ist, zu einem Substrat für die RNase H wird, was bedeutet, dass eine cyclische DNA, die mit einer Targetmessenger-RNA hybridisiert ist, einen antisense-Effekt ausüben kann aufgrund der Wirkung dieses Enzyms auf ein so erzeugtes Substrat. Darüber hinaus zeigt dieser Versuch auch, dass unter den Versuchsbedingungen einer identischen Konzentration das cyclische RNA/DNA-Substrat zu einem stärkeren Abbau durch die RNase H führt als das lineare RNA/DNA-Substrat. Unter identischen Bedingungen weisen bei im übrigen gleichen anderen Verhältnissen die cyclischen antisense-Oligodesoxyribonucleotide somit einen zusätzlichen Vorteil gegenüber den linearen antisense-Oligonucleotiden auf.

Beispiel 6

Inhibierung der Vermehrung des Virus Herpes Simplex vom Typ 1 Virus (HSV-1) durch cyclische antisense-Oligonucleotide

[0134] Das Oligonucleotid GT, dessen Sequenz nachstehend angegeben ist, wurde synthetisiert, cyclisiert oder nicht, und in den hier beschriebenen Versuchen verwendet, entweder in der linearen Form oder in der cyclischen Form.

1 – Versuchsprotokoll

Sequenz und Cyclisierung des Oligonucleotids GT

[0135] GT-Sequenz: 5' GTG GGA CGT TCC TCC TGC GGG AAG CGG C 3'

[0136] Um eine chemisch wirksame Cyclisierung zu ermöglichen, wurde das Oligonucleotid GT in der 3'P-Form synthetisiert und durch Positionierung der 5'- und 3'P-Enden cyclisiert durch Hybridisierung mit einem Oligonucleotid mit nachstehend angegeben, teilweise komplementären Sequenz: 5' CCA CGC CG 3'.

[0137] Die angewendeten Ligations-Bedingungen waren die folgenden:

auf 100 µg Oligonucleotid GT: 100 µg komplementäres Oligonucleotid

0,25 M MES, pH 7,4

20 mM MgCl₂

0,2 M CnBr

Reaktionsvolumen: 500 µl 30-minütige Inkubation bei 4°C. Die Reaktion wird gestoppt durch Zugabe von 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumenteilen absolutem Ethanol, die Oligonucleotide werden ausgefällt und gereinigt auf denaturierendem Polyacrylamidgel.

Infektion der Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von antisense-Oligonucleotiden

[0138] Die Zellen (Vero-Zellen ATCC – Passage 121 – , die in einem MEM (Gibco)-Medium, vervollständigt durch 5 oder 10% SVF, L-Glutamin, nicht-essentielle Aminosäuren und Penicillin/Streptomycin kultiviert wurden) werden am Vorabend der Infektion in einer Dichte von 5·10⁴ Zellen pro Vertiefung von 2 cm² überimpft. 16 bis 24 h danach werden die Zellen mit HSV1F mit einer Infektionsvervielfachung von 3 pfu/Zelle in Gegenwart oder Abwesenheit von Oligonucleotiden infiziert.

[0139] Die Oligonucleotide werden in dem Kulturmedium ohne Serum bis auf eine Konzentration von 2-fach gegenüber der gewünschten Endkonzentration verdünnt, um in einem Volumen von 50 µl zugegeben zu werden. Das Virus wird ebenfalls in einem Volumen von 50 µl zugegeben, 5 min später werden die Oligonucleotide zugegeben. Die Zellen werden dann in einem Volumen von 100 µl (50 µl Oligonucleotide + 50 µl Virus) 1 h lang bei 37°C unter schwachem Rühren alle 15 Minuten behandelt. Alternativ können die Oligonucleotide mehrere Stunden vor der Infektion zugegeben werden.

[0140] Nach 1-stündiger Inkubation wird das Medium abgesaugt und 500 µl Komplett-Medium werden auf die Zellen gegeben. Die Inkubation wird 24 h lang fortgesetzt, bevor sie durch Einfrieren der Platten in flüssigem Stickstoff gestoppt wird. Alle Inhibierungsmessungen werden doppelt oder dreifach durchgeführt.

Titration des Virus

[0141] Die Viren werden in dem Kulturmedium nach drei schnellen Einfrierungszyklen mit flüssigem Stickstoff/AufTauzyklen bei 37°C direkt zurückgewonnen. Sie werden anschließend in einem Medium ohne Serum verdünnt, um die genannte Titration durchzuführen.

[0142] Die Anzeige-Zellen werden am Vorabend in einem Komplett-Medium in einer Menge von 10^5 Zellen/Vertiefung von 2 cm² überimpft.

[0143] Am folgenden Morgen wird das Medium abgesaugt und man bringt 100 µl der verschiedenen Verdünnungen in jede Vertiefung. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37°C unter Röhren alle 15 min wird das Medium abgesaugt und die Zellen werden wieder mit dem Komplett-Medium bedeckt, das 1,2% Methylcellulose (Serum-Endkonzentration 2,5%) enthält, für 3 Tage bei 37°C.

[0144] Nach 3 Tagen wird das Medium entfernt, die Zellen werden mit PBS/10% Formol (37%ige Lösung) (20 min lang fixiert, dann mit Kristallviolett 2% (in PBS/20 % Ethanol) 20 min lang angefärbt. Die Platten werden anschließend gespült und die Zonen (Bereiche) werden als Transparenz in einem Negatoskop ausgezählt. Die Titrationen werden für jeden Punkt doppelt durchgeführt. Die Inhibierungsberechnungen werden vorgenommen im Verhältnis zu Viral-Titern, die in Abwesenheit des Oligonucleotids ermittelt wurden.

2 – Ergebnisse

Analyse der Effekte der cyclischen Oligonucleotide auf das Zellwachstum

[0145] Die **Fig. 9** zeigt die Ergebnisse der Messung des Zellwachstums (Vero-Zellen) in Gegenwart verschiedener Oligonucleotide, linear oder cyclisch, im Vergleich zu dem normalen Wachstum nur der Zellen. Bei diesem Versuch wurden die Oligonucleotide in einer Konzentration von 20 µM verwendet.

[0146] Die Ergebnisse zeigen, dass die Wachstumskurven einander überlagern. Die linearen oder cyclischen Oligonucleotide scheinen keinen toxischen Effekt auf das Zellwachstum zu haben.

Analyse der Effekte der cyclischen Oligonucleotide auf die Vermehrung von HSV-1

[0147] In diesem Versuch wurden die Effekte von antisense-Oligonucleotiden GT (deren Sequenz vorstehend angegeben ist) in der linearen Form oder in der cyclisierten Form miteinander verglichen. Es wurden zwei verschiedene Inhibierungszustände miteinander verglichen.

[0148] Bei A wurden die antisense-Verbindungen im Augenblick der Infektion zugegeben, während bei B sie 4 h nach der Infektion in das Medium eingeführt wurden. Die in der **Fig. 10** darstellten Ergebnisse zeigen, dass cyclische antisense-Oligonucleotide die Virus-Vermehrung inhibieren (hemmen). Die Hemmung beträgt 30% bei 2 µM und erreicht 65% bei 5 µM. Bei diesen niedrigen Konzentrationen weisen die cyclischen Oligonucleotide eine Inhibierungswirkung (Hemmungswirkung) auf, die höher ist als diejenige des linearen Oligonucleotids.

Beispiel 7

Eigenschaften der Oligonucleotide vom "sense"-Typ

1 - Herstellung von Oligonucleotiden vom sense-Typ

[0149] Die Versuchsbedingungen, welche die wirksame Ligation des Oligonucleotids erlauben, dessen Sequenz in der **Fig. 5-B** angegeben ist, sind ähnlich denjenigen, wie sie in Beispiel 1 beschrieben wurden.

[0150] Die Ligationsprodukte werden anschließend analysiert durch denaturierende Elektrophorese in einem Gel von 12% Polyacrylamid/7M Harnstoff.

[0151] Zur Herstellung von markierten geschlossenen sense-Oligonucleotiden, die in den Verzögerungsgel-Versuchen verwendet wurden, wurden die folgenden Bedingungen angewendet:

22 n mol Oligonucleotid werden bei 5' mit γ -32 ATP markiert (spezifische Aktivität $2-5 \times 10^8$ cpm/µg), 50 mM Tris HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mM BSA und 400 Einheiten der DNA Ligase T4 in einem Volumen von 10 µl. Die Inkubation wird 2 h lang bei 16°C durchgeführt. Die Ligationsprodukte werden durch denaturierende Elektrophorese in einem Gel aus 12% Polyacrylamid/7M Harnstoff gereinigt, wobei die dem geschlossenen Oligonucleotid entsprechenden Banden durch Autoradiographie nachgewiesen werden

nach dem Ausschneiden aus dem Gel und dem Isolieren der DNA durch klassische Verfahren zur Extraktion von Polyacrylamidgelen.

[0152] Alternativ werden die Produkte der Ligationsreaktion ohne vorherige Reinigung verwendet nach der Inaktivierung der DNA-Ligase durch 2-minütiges Erhitzen des Ligationsmediums auf 90°C werden sie mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, extrahiert, mit absolutem Alkohol in Gegenwart von 20 µg Glycogen als Schleppmittel ausgefällt und mit 80%igem Alkohol gewaschen.

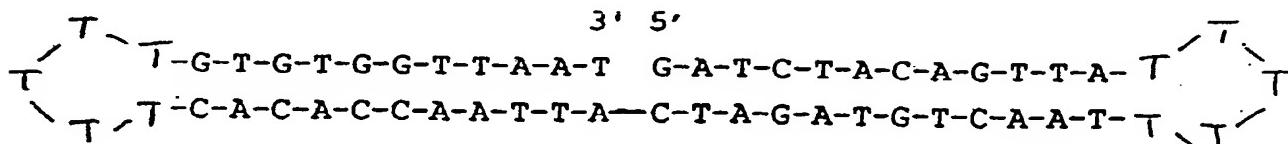
2 – Resistenz der Oligonucleotid vom sense-Typ gegenüber Serumnukleasen

[0153] Die "sense"-Oligonucleotide weisen eine Resistenz gegenüber dem nucleolytischen Abbau auf, wenn sie in Gegenwart des Serums inkubiert worden sind. Die vorgenommenen Vergleiche zwischen der Resistenz der cyclischen Oligonucleotide und der linearen doppelsträngigen Oligonucleotide ergeben die gleichen Ergebnisse wie diejenige, die in der Fig. 7-C dargestellt sind. In allen Fällen weisen die geschlossenen Oligonucleotide eine höhere Resistenz auf als die nicht-geschlossenen Oligonucleotide. Die Halbwertszeit der geschlossenen sense-Oligonucleotide ist um mindestens einen Faktor 10 höher als diejenige der nicht-geschlossenen linearen doppelsträngigen Oligonucleotide, die freie 3'- und 5'-Enden aufweisen.

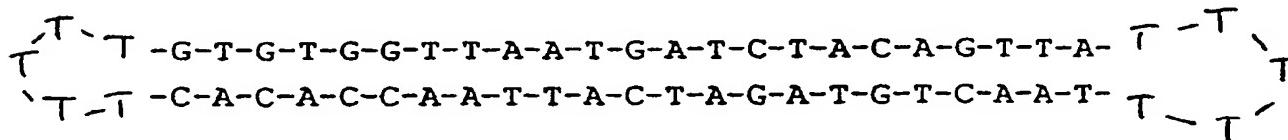
3. Nachweis der Fixierung des Transkriptionsfaktors HNF-1 durch ein cyclisches Oligonucleotid vom sense-Typ das die Erkennungs-Sequenz in einer selbst gepaarten Form aufweist

[0154] Es wurden die folgenden Versuchen mit den Oligonucleotiden durchgeführt, deren Sequenz nachstehend angegeben ist:

HNF-1, nicht ligiert



HNF1-cyclisch (HNF1-C):



HNF1-linear, doppelsträngig (HNF1-LB):

-G-T-G-T-G-G-T-T-A-A-T-G-A-T-C-T-A-C-A-G-T-T-A-
-C-A-C-A-C-C-A-A-T-T-A-C-T-A-G-A-T-G-T-C-A-A-T-

[0155] Es wurde die Wirksamkeit der Fixierung des Transkriptionsfaktors HNF1 (erhalten aus nuclearen Leberextrakten) auf linearen Doppelstrang-Oligonucleotiden verglichen mit denjenigen von Nukleotiden in Haarspangen-Form, und nicht ligierten oder geschlossenen cyclischen Oligonucleotiden unter der Einwirkung der Ligase T4 (die Sequenz des verwendeten cyclischen Oligonucleotids ist in der Fig. 5-B angegeben).

[0156] 3 fmole jedes Oligonucleotids (spezifische Aktivität 7000 cpm/f mole für das lineare Doppelstrang-Oligonucleotid und 3500 cpm/f mole für die anderen Oligonucleotide) werden in einem Endvolumen von 14 µl mit 1 µg eines nuclearen Leberproteinextrakts in 10 mM Hepes pH 7,9, 50 mM KCl, 10% Glycerin, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 6 mM MgCl₂, 6 mM Spermin in Gegenwart von 1,5 µg Poly(dI.dC)-poly(dI.dC) und 250 ng DNA Lachsspermien, die mit Ultraschall behandelt worden sind, als nicht-spezifische Konkurrenten, inkubiert. Nach 10 min bei 4°C werden die Reaktionsmischungen sowie die Kontrollen, in denen die Zugabe der Proteine weggelassen wurde, auf einem nativen Gel aus 6% Polyacrylamid/0,25 × TBE abgeschieden. Am Ende der Laufzeit (Wanderung) wird das Gel in einer Lösung von 10% Essigsäure, 10% Metanol fixiert, auf ein 3MM-Papier übertragen, getrocknet und autoradiographiert. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in der Fig. 11 dargestellt.

[0157] Man stellt fest, dass

1. die Affinität zur Fixierung des Transkriptionsfaktors bei dem geschlossenen cyclischen Oligonucleotid

ähnlich ist der Fixierung, die für die linearen Doppelstrang-Oligonucleotide festgestellt wurde (oder in Form einer Haarnadel, wobei diese Ergebnisse hier nicht darstellt sind). Diese Strukturen können somit als Agens zum Fixieren von Transkriptionsfaktoren, Transaktivatoren oder allen anderen Proteinen verwendet werden, die sich an einer spezifischen DNA-Sequenz fixieren lassen.

2. Die Fixierung des Transkriptionsfaktors HNF1 auf dem nicht ligierten cyclischen Oligonucleotid ist 5- bis 10-mal geringer als diejenige, die bei dem cyclisierten Oligonucleotid beobachtet wurde für die Wirkung der Ligase. Die Ligationsstelle bei dem sense-Oligonucleotid ist zentriert in dem doppelsträngigen Abschnitt und entspricht der Pseudopalindrom-Achse, welche die Fixierungsstelle des Dimers von HNF1 darstellt. Die Anwesenheit einer "Einkerbung" (nick) destabilisiert somit die DNA/Protein-Bindung. Dieses Ergebnis bestätigt die geschlossene Natur des durch die Ligase T4 behandelten cyclischen "sense"-Oligonucleotids.

Literaturstellen, die im Text genannt sind

- [0158] Andrus, A.; Geiser, T.; Zon, G. (1989), "Nucleosides Nucleotides", 8, 5–6, 967–8
- [0159] Anfossi, Giovanni; Gewirtz, Alan M.; Calabretta, Bruno, (1989), "Proc. Natl. Acad. Sci." U.S.A., 86, 3379–83
- [0160] Barbato, S., De Napoli, L., Mayol, L., Piccialli, G und Santacroce, C. (1989). "Tetrahedron", 54, 4523–4536
- [0161] Bazile D; Gautier C; Rayner B; Imbach J L; Paoletti C; Paoletti J, (1989), "Nucleic Acids Res", 17, 7749–59
- [0162] Bertrand J R; Imbach J L; Paoletti C; Malvy C, (1989), "Biochem Biophys Res Commun", 164, 311–8
- [0163] Cameron F H; Jennings P A, (1989), "Proc Natl. Acad. Sci." U.S.A., 86, 9139–43
- [0164] Caruthers, M. H. (1985) "Sciences", 230, 281
- [0165] Cazenave C; Chevrier M; Nguyen T T; Helene C, (1987), "Nucleic Acids Res", 15, 10507–10521
- [0166] Cazenave, C.; Stein, C. A.; Loreau, N.; Thuong, N. T.; Neckers, L. M.; Subasinghe, C.; Helene, C.; Cohen, J. S.; Toulme J. S., (1989), "Nucleic Acids Res", 17, 4255–73
- [0167] Chang, E. H.; Yu, Z.; Shinozuka, K.; Zon, G.; Wilson, W. D.; Strekowski, A., (1989), "Anti-Cancer Drug Des.", 4, 221–32 Cope, F. O.; Wille, J. J., (1989), "Proc. Natl. Acad. Sci." U.S.A., 86, 5590–4
- [0168] Cotton M. und Birnstiel M L. (1989). EMBO J. 8, 3861–3866
- [0169] Cotten M; Schaffner G; Birnstiel M L, (1989), Mol Cell Biol, 9, 4479–87
- [0170] Degols, G.; Leonetti, J. P.; Gagnor, C.; Lemaitre, M.; Lebleu, B.; (1989), "Nucleic Acids Res.", 17, 9341–50
- [0171] De Vroom E., Broxterman, H. J., Siedregt, L. A. J., Van der Marel, G. A., Van Broom, J. H., "Nucl. Ac. Res.", 16, 4607–4620
- [0172] Dervan PB, (1986), "Science", 232, 464–71
- [0173] Durand M; Maurizot J C; Asseline U; Barbier C; Thuong N T; Helene C, (1989), "Nucleic Acids Res", 17, 1823–1837
- [0174] Fedor M J; Uhlenbeck OC, (1990), "Proc. Natl. Acad. Sci.", 87, 1668–72
- [0175] Francois J C; Saison-Behmoaras T; Barbier C; Chassignol M; Thuong N T; Helene C, (1989), "Proc. Natl. Acad. Sci.", 86, 9702–9706
- [0176] Francois J C; Saison-Behmoaras T; Chassignol M; Thuong N T; Helene C, (1989), "J. Biol. Chem.", 264 5891–5898
- [0177] Francois J C; Saison-Behmoaras T; Helene C, (1988), "Nucleic. Acids. Res.", 16, 11431–11440
- [0178] Francois J C; Saison-Behmoaras T; Thuong N T; Helene C, (1989), "Biochemistry", 28, 9617–9619
- [0179] Froehler, B. C., Ng, P und Matteucci, M. D. (1986) "Nucl. Acid. Res.", 14, 5399
- [0180] Gagnor, C., Bertrand, J. R., Thenet, S., Lemaitre, M., Morvan, F., Rayner, B., Malvy, C., Lebleu, B., Imbach, J. L., Paoletti, C., (1987), "Nucleic. Acids. Res.", 15, 10419–36
- [0181] Gao, W., Stein, C. A., Cohen, J. S., Dutchmann, G. und Cheng, Y. C., (1988). "J. Biol. Chem.", 264, 11521–11532
- [0182] Goodchild, John; Agrawal, Sudhir; Civeira, Maria P.; Sarin, Prem S.; Sun, Daisy; Zamecnik, Paul C., (1988), "Proc. Natl. Acad. Sci." U.S.A., 85, 5507–11
- [0183] Haseloff J; Gerlach W L, (1988), "Nature", 334, 585–91
- [0184] Helene C, (1989) "Br. J. Cancer", 60, 157–60
- [0185] Helene C; Thuong N T, (1988), "Biochem Pharmacol", 37, 1797–1798
- [0186] Jeffries A C; Symons R H, (1989), "Nucleic. Acids. Res.", 17, 1371–7
- [0187] Jessus C; Chevrier M; Ozon R; Helene C; Cazenave C, (1989), "Gene", 72, 311–312
- [0188] Kabanov, A. V.; Vinogradov, S. V.; Ovcharenko, A. V.; Krivonos, A. V.; Melik-Nubarov, N. S.; Kiselev, V. I.; Severin, E. S., (1990), "FEBS Lett.", 259, 327–30
- [0189] Le Doan T; Chavany C; Helene C, (1989) "Bull Cancer", 76, 849–52
- [0190] Leonetti, J. P., Degols, G., Milhaud, P., Gagnor, C., Lemaitre, M., Lebleu, B., (1989), "Nucleosides Nu-

cleotides", 8, 5–6, 825–8

- [0191] Maher, Louis J, III; Dolnick, Bruce J., (1988), "Nucleic. Acids. Res.", 16, 3341–58
- [0192] Marcus-Sekura, Carol J.; Woerner, Amy M.; Shinozuka, Kazuo; Zon, Gerald; Quinnan, Gerald V., Jr., (1987), "Nucleic. Acids. Res.", 15, 5749–63
- [0193] Matsukura, Makoto; Zon, Gerald; Shinozuka, Kazuo; Robert-Guroff, Marjorie; Shimada, Takashi; Stein, C. A.; Mitsuya, Hiroaki; Mitsuya, Hiroaki; Wong-Staal, Flossie; et al., (1989), "Proc. Natl. Acad. Sci." U.S.A., 86, 4244–8
- [0194] Mirochnichenko, O. I.; Ponomareva, T. I.; Tikhonenko, T. I., (1989), "Gene", 84, 83–9
- [0195] Perbost M; Lucas M; Chavis C; Pompon A; Baumgartner H; Rayner B; Griengl N; Imbach J L, (1989), "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 165, 742–7
- [0196] Perrouault, L.; Asseline, U.; Rivalle, C.; Thuong, N. Y.; Bisagni, E.; Giovannelli, C.; Le-Doan, T. und Helene, C. (1990), "Nature", 344, 358–361
- [0197] Sampson, J. R.; Sullivan, F. X.; Behlen, L. S.; DiRenzo, A. B.; Uhlenbeck, O. C., (1987), "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 52, 267–75
- [0198] Sankar, Sabita; Cheah, Keat Chye; Porter, Alan G., (1989), "Eur. J. Biochem.", 184, 39–45
- [0199] Sarver, N.; Cantin, E. M.; Pairoj, S. C.; Zaia, J. A.; Ladne, P. A.; Stephens, D. A. und Rossi, J. J. (1990). "Science", 247, 1222–1225.
- [0200] Sheldon C C; Symons R H, (1989), "Nucleic. Acids. Res.", 17, 5679–85
- [0201] Sheldon C C; Symons R N, (1989), "Nucleic. Acids. Res.", 17, 5665–77
- [0202] Shuttleworth, John; Matthews, Glenn; Dale, Les; Baker, Chris; Colman, Alan, (1988), "Gene", 72, 1–2, 267–75
- [0203] Stevenson, Mario; Iversen, Patrick L., (1989), "J. Gen. Virol.", 70, 2673–82
- [0204] Sun J S; Asseline U; Rouzaud D; Montenay-Gerestier T; Nguyen T T; Helene C, (1987), "Nucleic. Acids. Res.", 15, 6149–58
- [0205] Sun J S; Francois J C; Lavery R; Saison-Behmoaras T; Montenay-Gerestier T;
- [0206] Thuog N T; Helene C, (1988), "Biochemistry", 27, 6039–6045
- [0207] Sun J S; Francois J C; Montenay-Gerestier T; Saison-Behmoaras T; Roig V; Thuong N T; Helene C, (1989), "Proc. Natl. Acad. Sci." 86, 9198–9202
- [0208] Symons R H, (1989), "Trends Biochem. Sci.", 14, 445–50
- [0209] Symons R N; Hutchins C H; Forster A C; Rathjen P D; Keese P; Visvader J E, (1987), "J. Cell. Sci. Suppl.", 7, 303–18
- [0210] Tortora, Giampaolo; Clair, Timothy; Cho-Chung, Yoon Sang, (1990), "Proc. Natl. Acad. Sci." U.S.A., 87, 705–8
- [0211] Toulme J J; Krisch H M; Loreau N; Thuong N T; Helene C, (1986), "Proc. Natl. Acad. Sci.", 83, 1227–31
- [0212] Trung Le Doan; Perrouault L; Chassignol M; Nguyen T T; Helene C, (1987), "Nucleic. Acid. Res.", 15, 8643–8659
- [0213] Uhlenbeck, Olke C., (1987), "Nature", 328, 596–600
- [0214] Uhlenbeck, Olke C.; Dahm, Sue Ann C.; Ruffner, Duane E.; Fedor, Martha J., (1989), "Nucleic. Acids. Symp. Ser.", 21, 95–6
- [0215] Vasseur, M. (1990), "Biofutur", April 1990, 18–28.
- [0216] Verspieren P; Cornelissen A W; Thuong N T; Helene C; Toulme J J, (1987), "Gene", 61, 307–315
- [0217] Vlassov, V. V.; Zarytova, V. F.; Kutiavin, I. V.; Mamaev, S. V. und Podyminogin, M. A. (1986) "Nucl. Acids. Res.", 14, 4065–4076.
- [0218] Wang A. H.; Cottens S.; Dervan P. B.; Yesinowski J. P.; van der Marel G. A.; van Boom J. H., (1989), "J. Biomol. Struct. Dyn.", 7, 101–17
- [0219] Westermann, P.; Gross, B.; Hoinkis, G.; (1989), "Biomed. Biochim. Acta", 48, 85–93
- [0220] Zerial A; Thuong N T; Helene C, (1987), "Nucleic. Acids. Res.", 15, 9909–9919
- [0221] Zheng, H.; Sahai, Beni M.; Kilgannon, P.; Fotedar, A.; Green, D. R., (1989), "Proc. Natl. Acad. Sci." U.S.A., 86, 3758–62.

Patentansprüche

1. Mittel vom Ohigonukleotid-Typ, gebildet aus einer oder mehreren einzelsträngigen Oligonukleotidsequenz(en), deren Enden miteinander durch kovalente Bindungen verbunden sind unter Bildung von mindestens teilweise einer geschlossenen einzelsträngigen Struktur, wobei das Mittel **dadurch gekennzeichnet** ist, dass es aus wenigstens einer Sequenz gebildet wird, die ausgewählt ist unter den folgenden Sequenzen:
 a) einem Antisinn-Oligonukleotid;
 b) einem Sinn-Oligonukleotid, das durch ein natürliches Protein spezifisch erkannt wird.

2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es aus einem Antisinn-Oligonukleotid gebildet

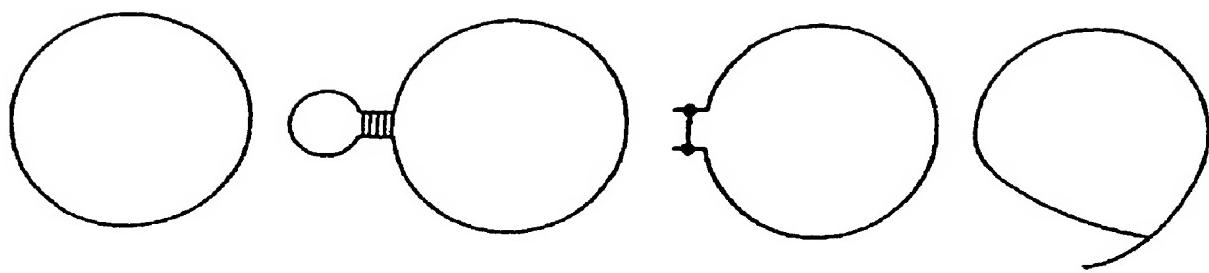
wird.

3. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass es aus einer einzelsträngigen Oligonukleotidsequenz gebildet wird, deren 5'- und 3'-Enden durch eine kovalente Nicht-Nukleotid-Struktur verbunden sind.
4. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass es aus einer einzelsträngigen Oligonukleotidsequenz gebildet wird, deren 5'- und 3'-Enden miteinander durch eine Verbindung durch eine Nukleotid-Bindung verbunden sind.
5. Mittel nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotidsequenzen keinerlei freies 5'- oder 3'-Ende umfassen.
6. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, das aus einem Antisinn-Oligonukleotid gebildet wird, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleotidsequenz(en) der Zusammensetzung keine Fragmente umfassen, die zur Selbstpaarbildung in der Lage sind.
7. Mittel nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine Oligonukleotidsequenz die zu einer mRNA-Region oder einem Fragment natürlicher DNA komplementäre Sequenz ist.
8. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Polyribonukleotid-Abschnitt umfasst, der in der Lage ist, eine trans-Spaltungsaktivität auf eine RNA auszuüben.
9. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotidsequenzen Fragmente umfassen, die zu einer Paarbildung unter Bildung von doppelsträngigen Selbstpaarungen in der Lage sind.
10. Mittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Fragmente, die zu einer Paarbildung in der Lage sind, durch Fragmente, die zu einer Paarbildung nicht in der Lage sind, getrennt sein können.
11. Mittel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das natürliche Protein ein Transkriptionsfaktor ist.
12. Mittel nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Transkriptionsfaktor HNF-1 ist.
13. Mittel nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Fragmente, die zu einer Paarbildung in der Lage sind, durch Fragmente, die zu einer Paarbildung nicht in der Lage sind, getrennt sein können.
14. Mittel nach einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotidsequenz(en) hintereinander angeordnete natürliche oder nicht-natürliche Desoxyribo- oder Ribonukleotide umfassen können.
15. Mittel nach einem der Ansprüche 11 und 14, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung, die eine biologische Aktivität aufweist, auf die geschlossene einzelsträngige Struktur aufgepropft ist.
16. Mittel nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung auf die kovalente Nicht-Nukleotid-Struktur aufgepropft ist.
17. Mittel nach einem der Ansprüche 11, 14–16, dadurch gekennzeichnet, dass die kovalente Nicht-Nukleotid-Struktur eine Peptidstruktur ist.
18. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 11, 14–17, dadurch gekennzeichnet, dass die kovalente Nicht-Nukleotid-Struktur eine wenigstens teilweise lipidartige Struktur ist.
19. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 11, 14–18, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotidsequenz ausschließlich aus hintereinander angeordneten natürlichen oder nicht-natürlichen Desoxyribo-Verbindungen oder hintereinander angeordneten natürlichen oder nicht-natürlichen Ribo-Verbindungen besteht.
20. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 11, 14–19, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleotidsequenzen es diesem erlauben, eine doppelsträngige Struktur anzunehmen, innerhalb von welcher antiparallele und/oder parallele Paarungen in einer Konformation vom Moebius-Typ auftreten.

DE 692 33 117 T2 2004.04.15

21. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 11, 14–20, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotidsequenzen zwischen 10 und 200 Nukleotiden umfassen.
22. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass man die partielle oder vollständige chemische Synthese der einzelsträngigen Kette der Verbindung vornimmt, bevor man sie cyclisiert.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotidsequenz durch ein biologisches Verfahren erhalten wird.
24. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 11, 14–21 für die Herstellung eines Arzneimittels.
25. Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 11, 14 bis 21 für die Herstellung eines antiviralen oder Antikrebs-Arzneimittels.
26. Mittel nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel natürliche immunmodulierende Substanzen induziert.
27. Mittel nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel Interferone induziert.
28. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 11, 14 bis 21 für die Herstellung eines Arzneimittels, das dazu bestimmt ist, auf spezifische Weise auf die Transkription oder die Translation von Proteinen, deren Expressionsniveau man zu modulieren wünscht, einzuwirken.
29. Mittel nach Anspruch 28 als Mittel zur Unterdrückung oder Hemmung der Expression von Proteinen, die direkt an Krankheiten, die mit Proliferation und Differenzierung in Zusammenhang stehen, beteiligt sind.
30. Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 11, 14 bis 21 für die Herstellung eines Diagnosemittels.
31. Verwendung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel markiert ist.
32. Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 11, 14 bis 21 in der Kosmetik.
33. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie als Wirkstoff wenigstens ein Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 11, 14 bis 21 umfasst.
34. Zusammensetzung nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutische Zusammensetzung in einer auf topischen äußerlichem Wege verabreichbaren Form vorliegt.
35. Zusammensetzung nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine antivirale Zusammensetzung handelt.

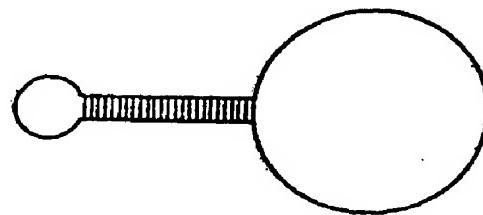
Es folgen 16 Blatt Zeichnungen



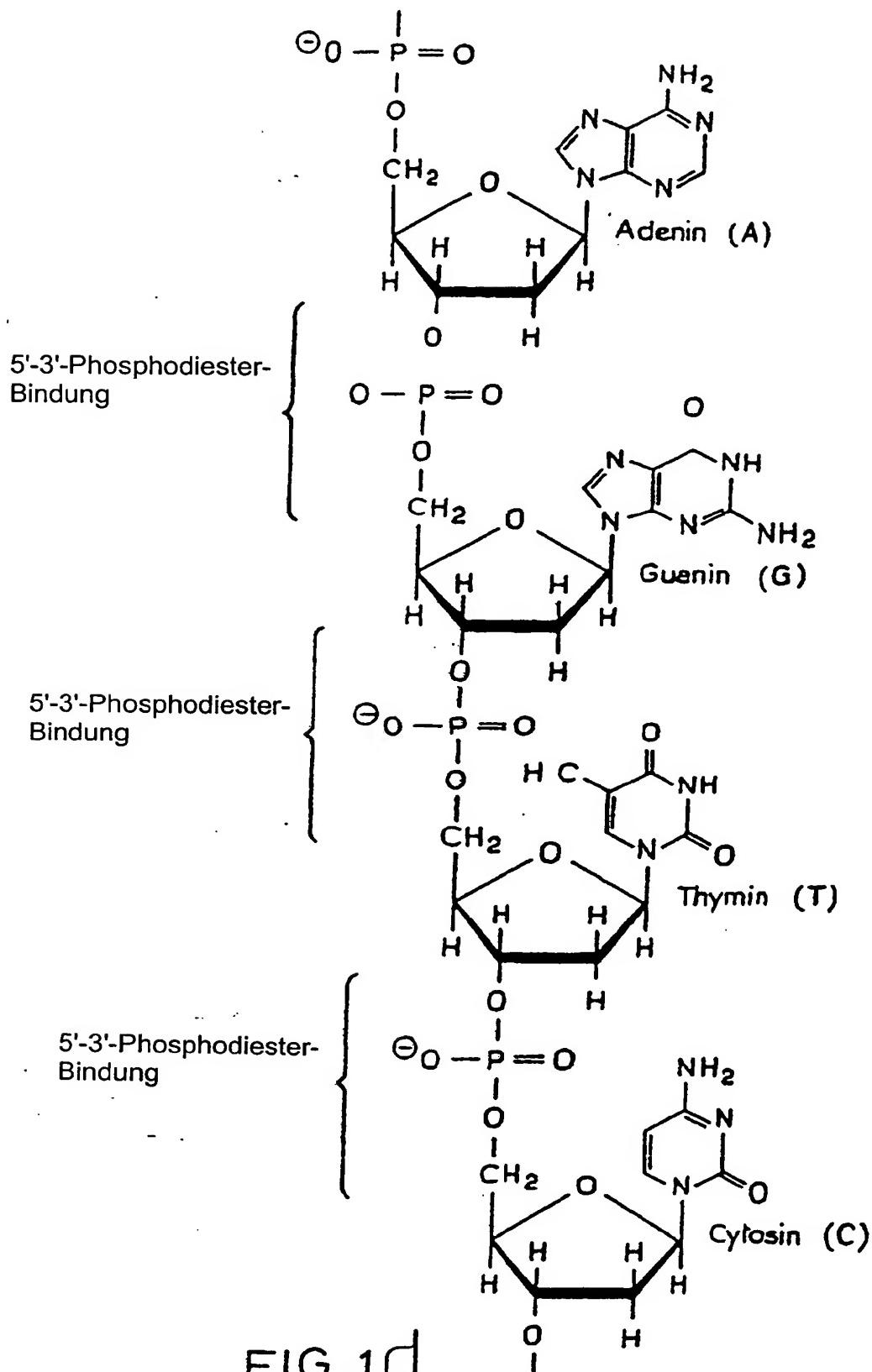
Figur 1A

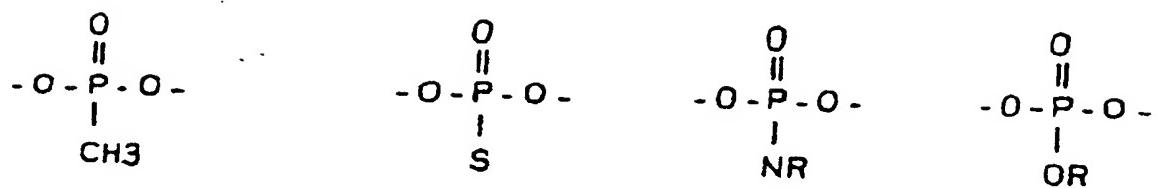
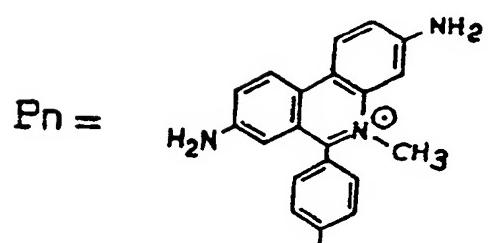
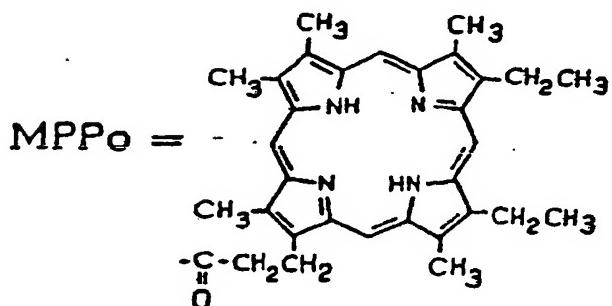
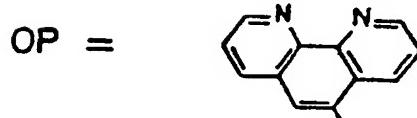
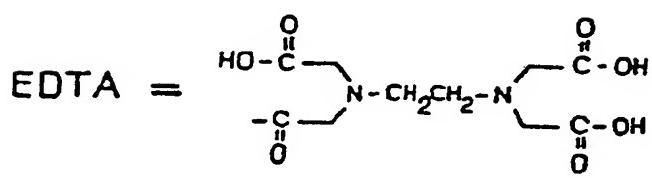
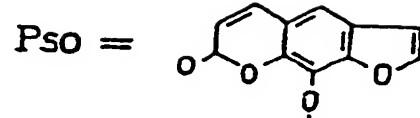
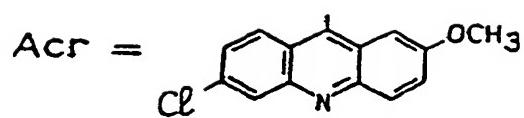


Figur 1B

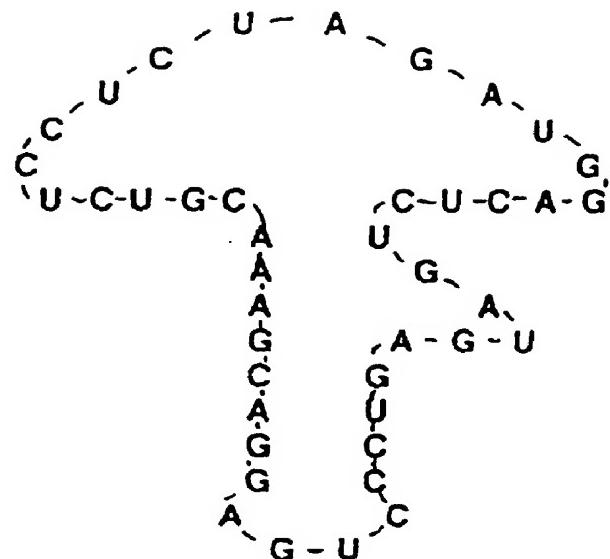


Figur 1C

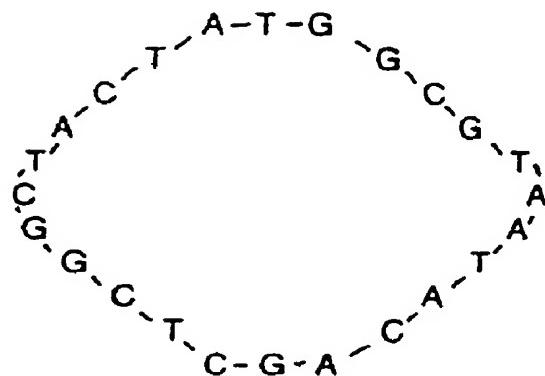
FIG. 1D

FIG. 2AFIG. 2B

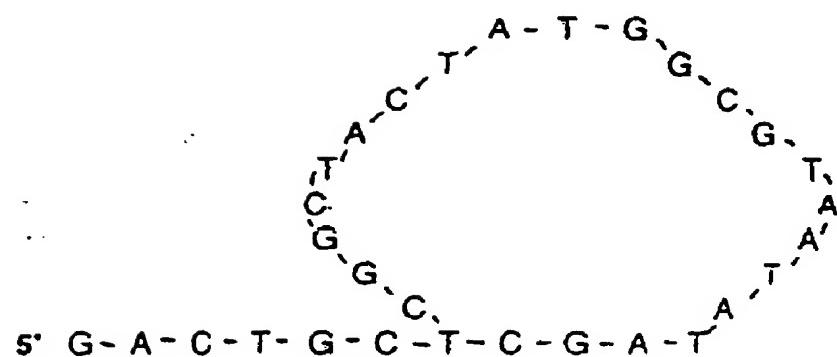
FIGUR 3.



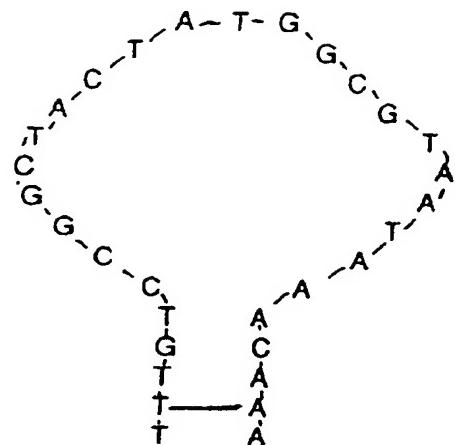
FIGUR 4.A.



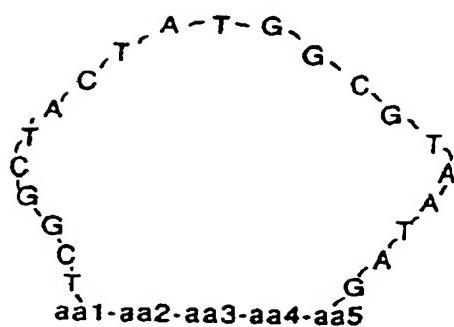
FIGUR 4.B.



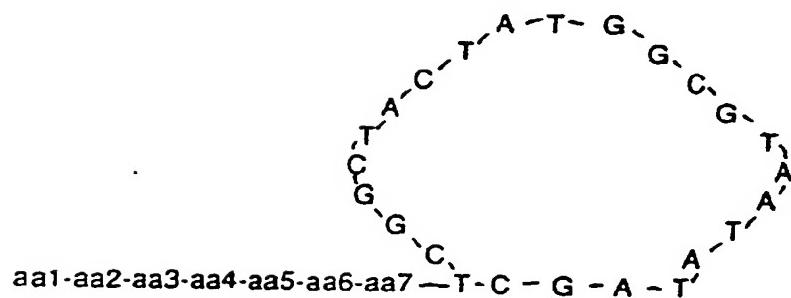
FIGUR 4.C.



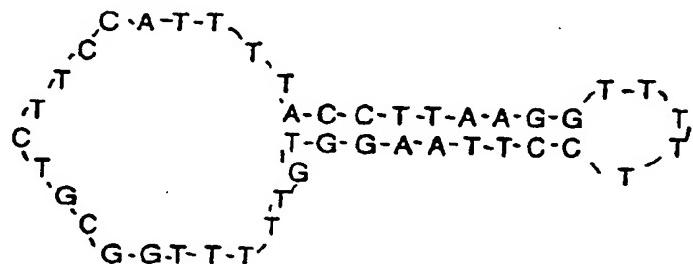
FIGUR 4.D.



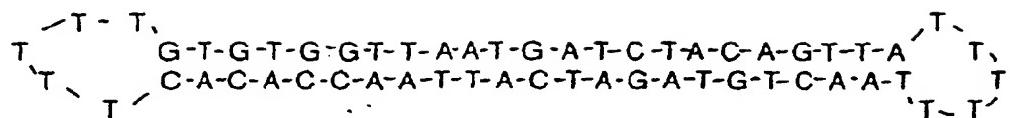
FIGUR 4.E.



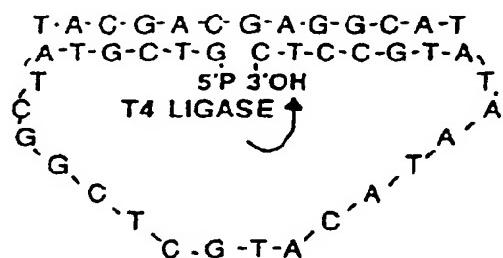
FIGUR 5-A.



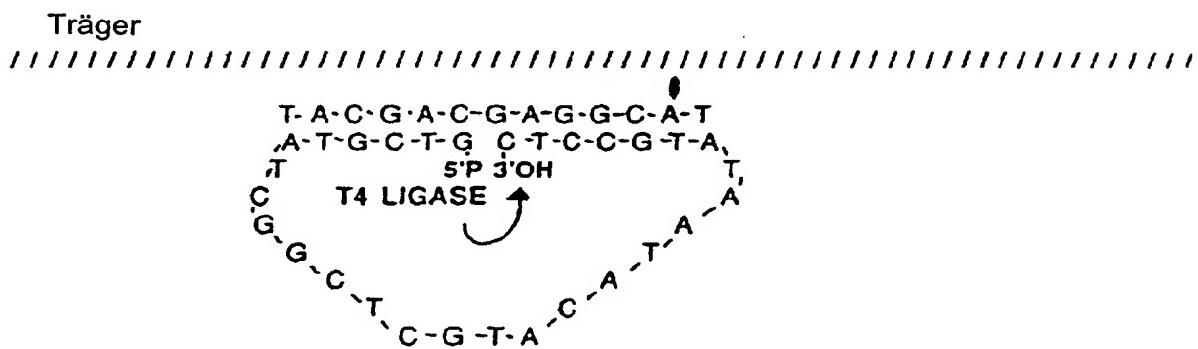
FIGUR 5-B.



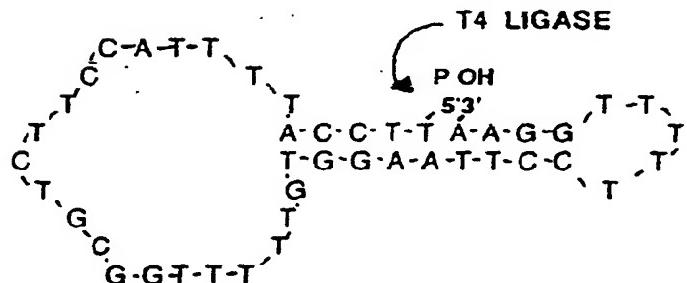
FIGUR 6-A.



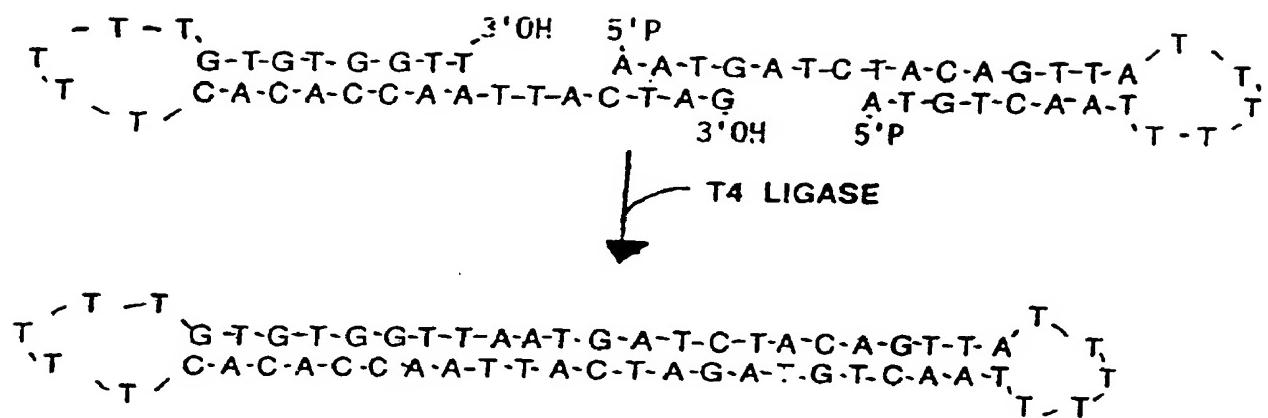
FIGUR 6-B.

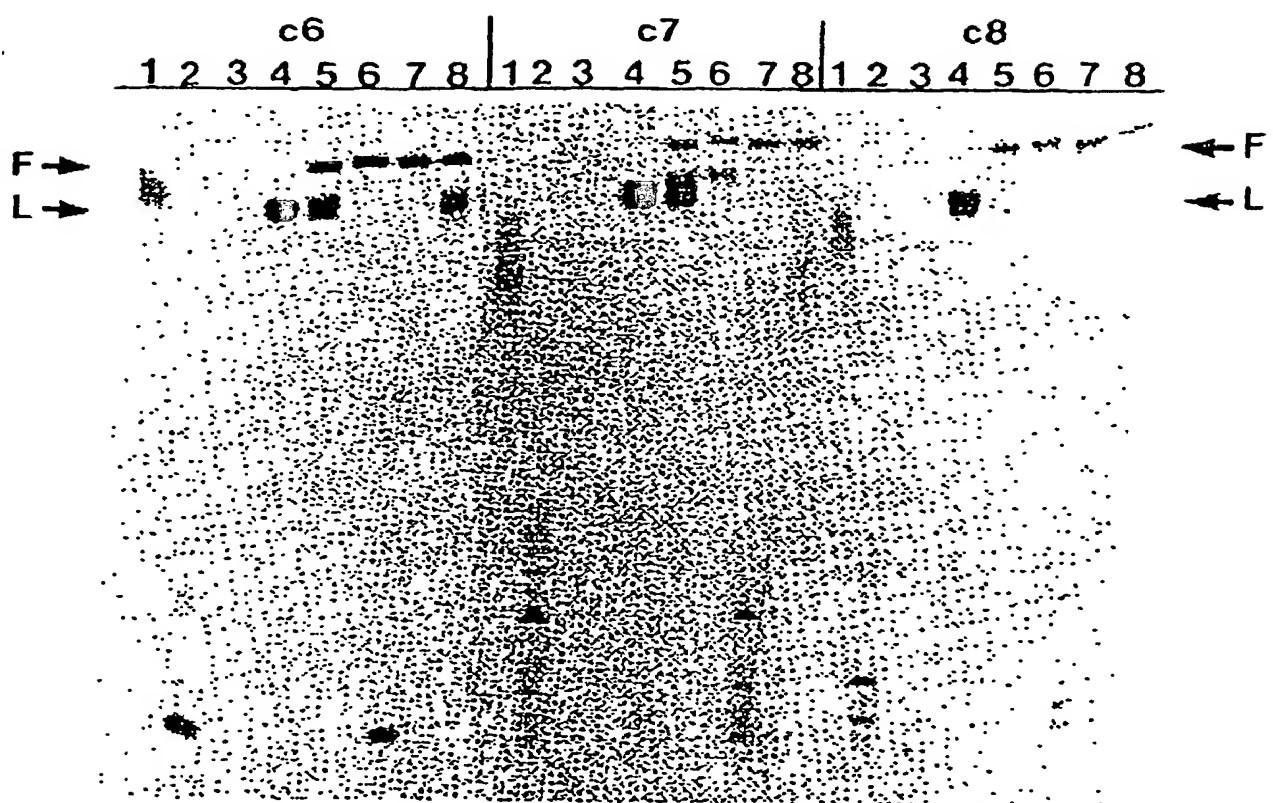


FIGUR 6-C.

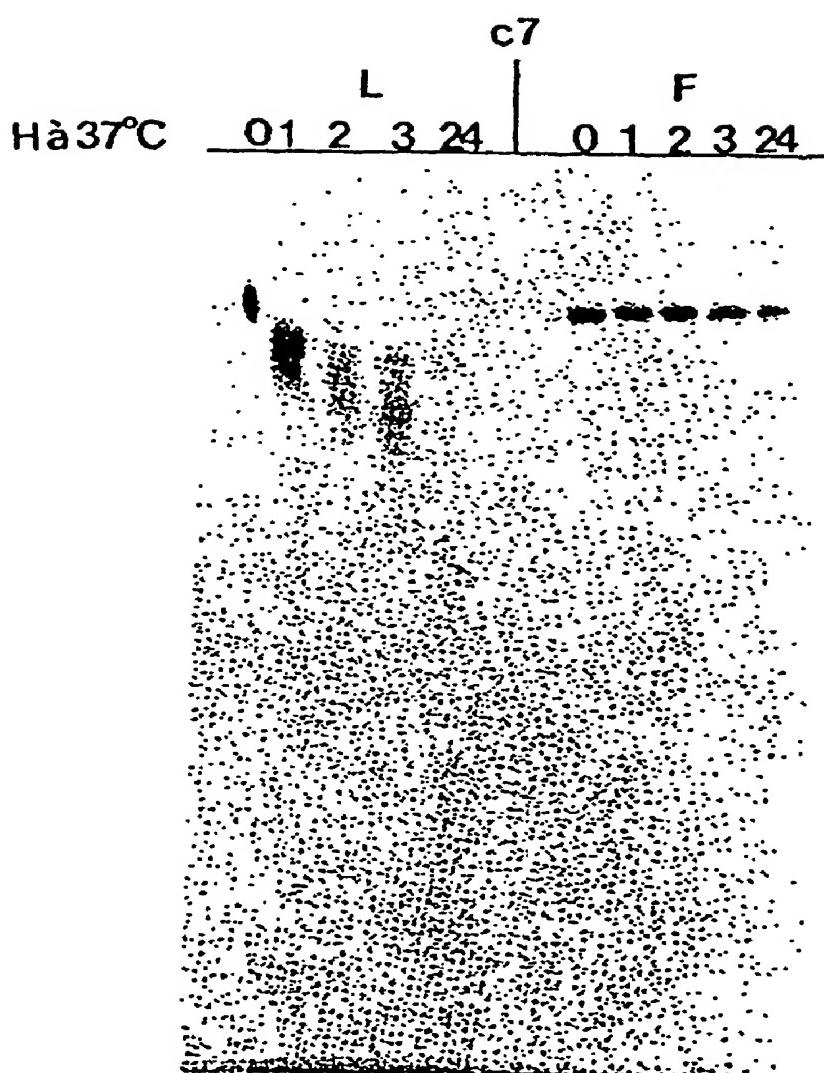


FIGUR 6-D.

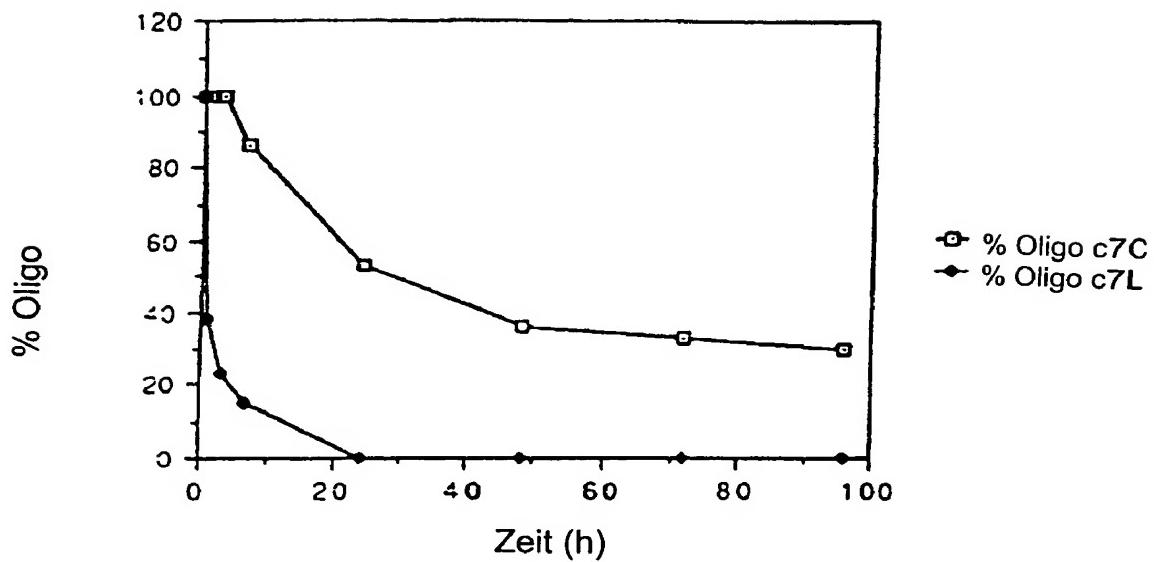




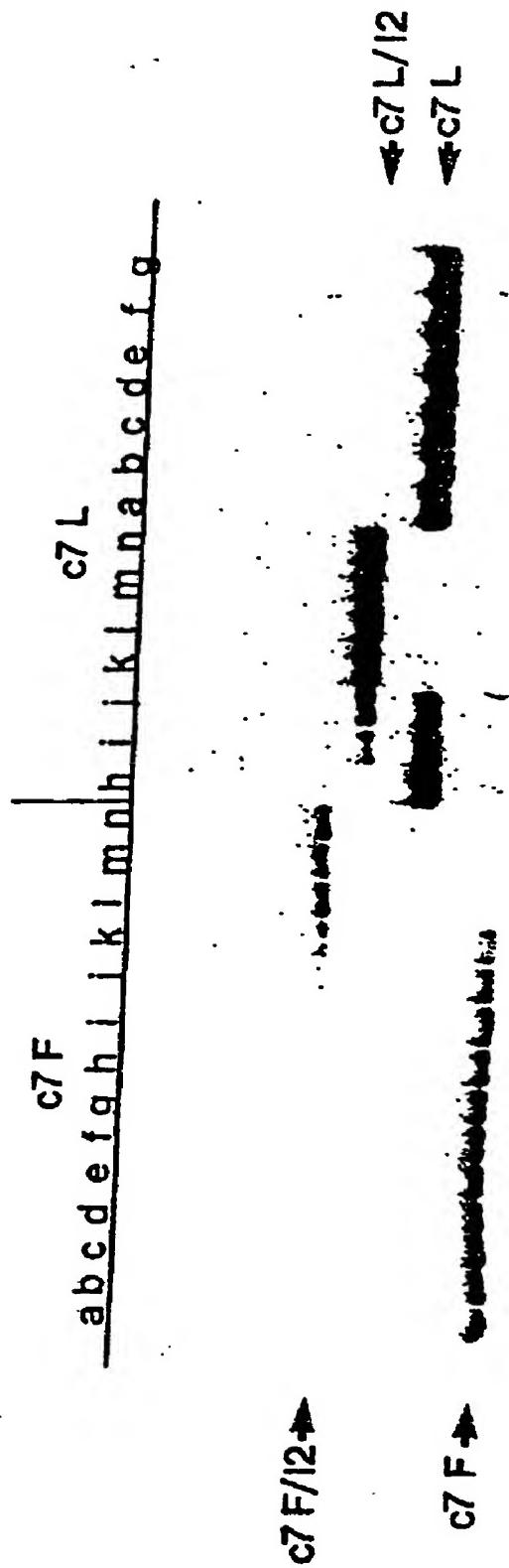
FIGUR 7-A



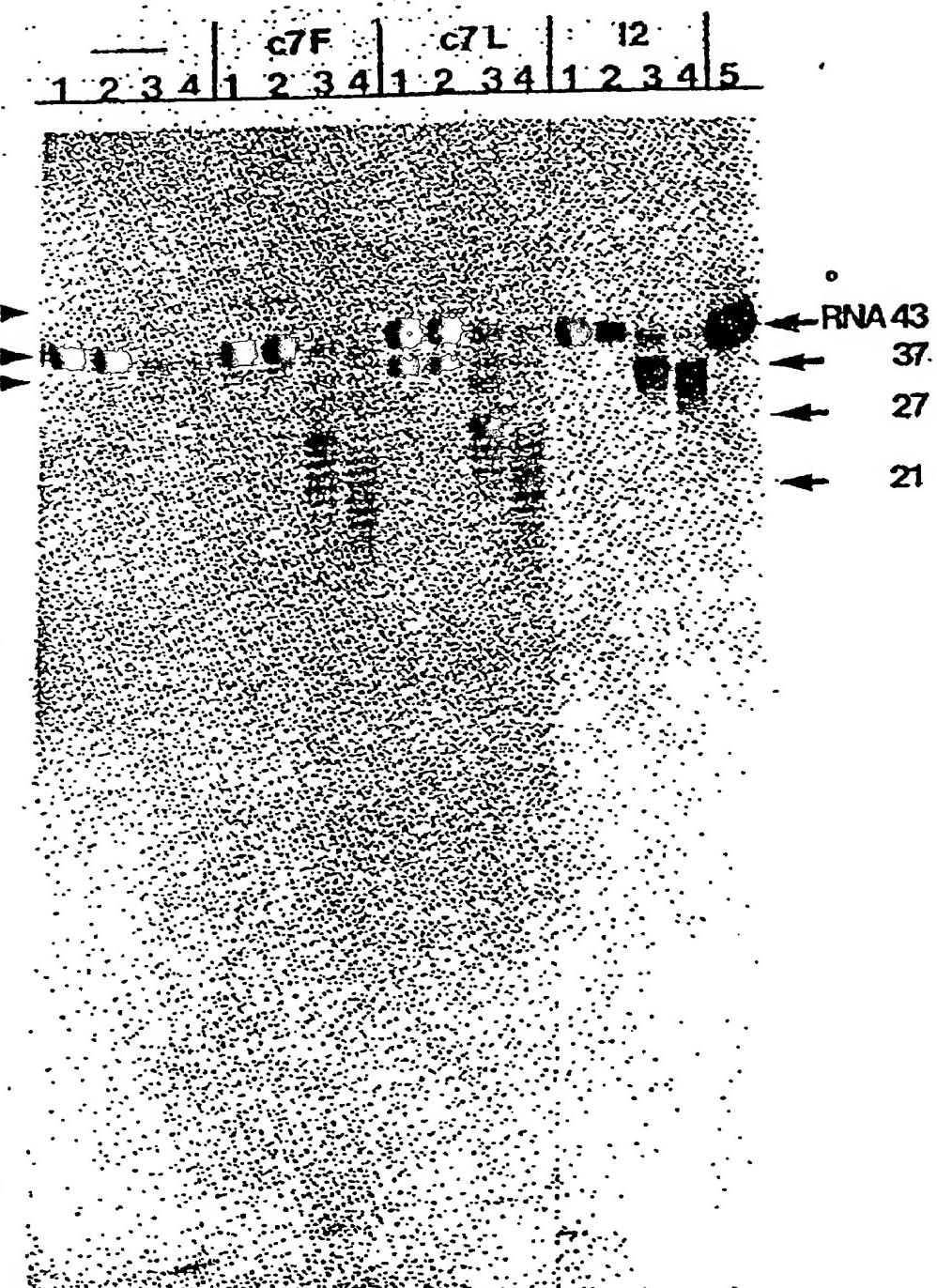
FIGUR 7-B



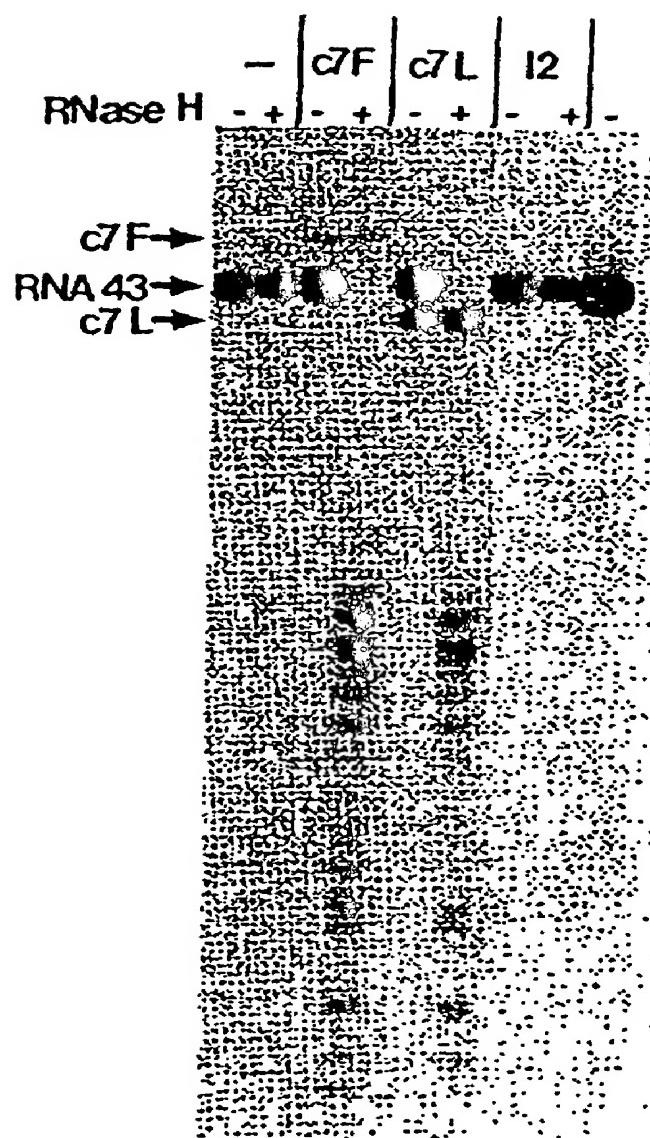
FIGUR 7-C



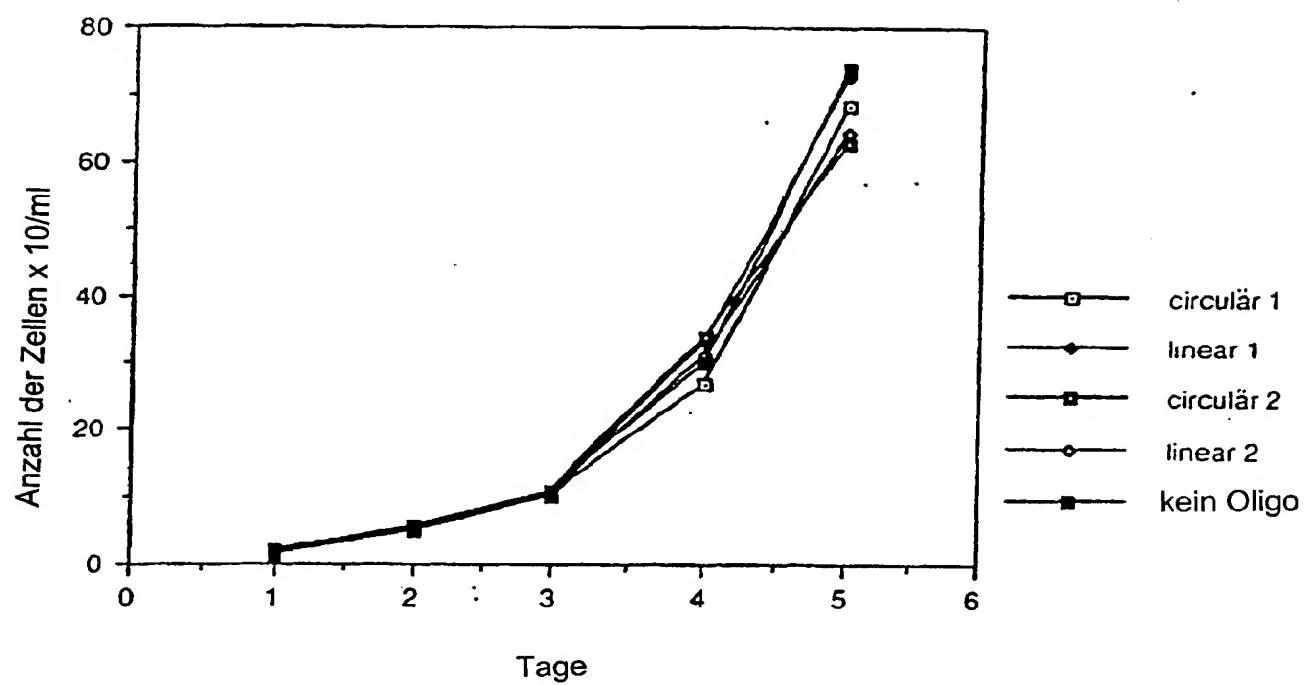
FIGUR 8-A



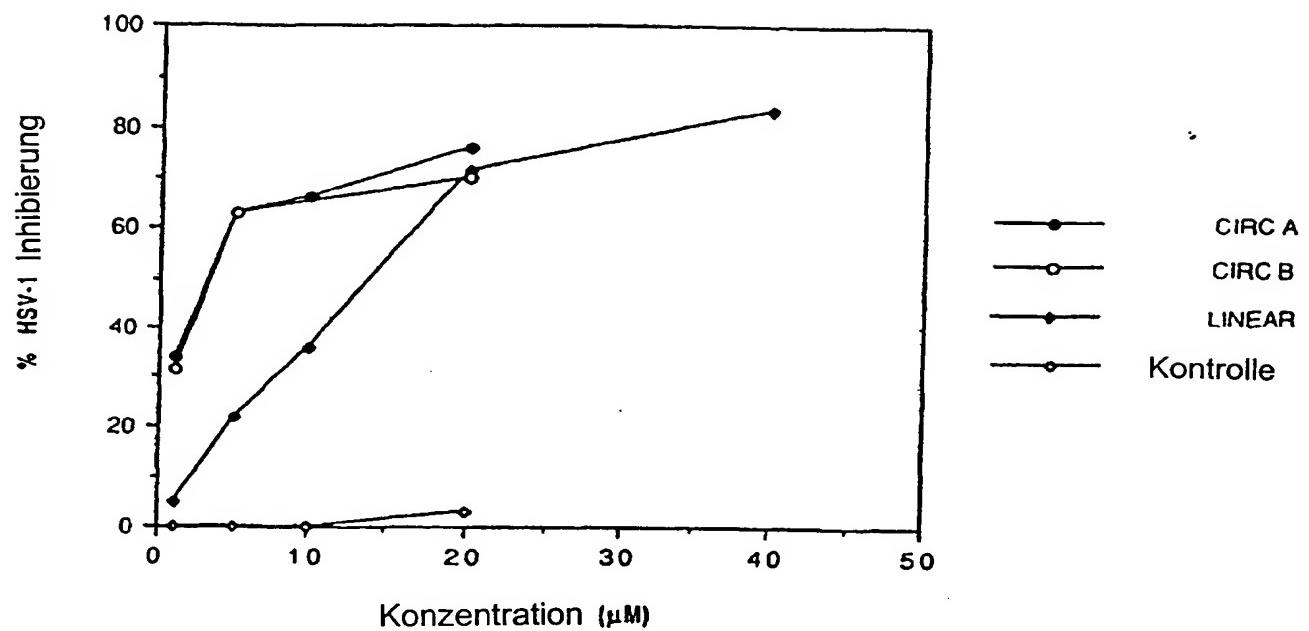
FIGUR 8-B



FIGUR 8-C

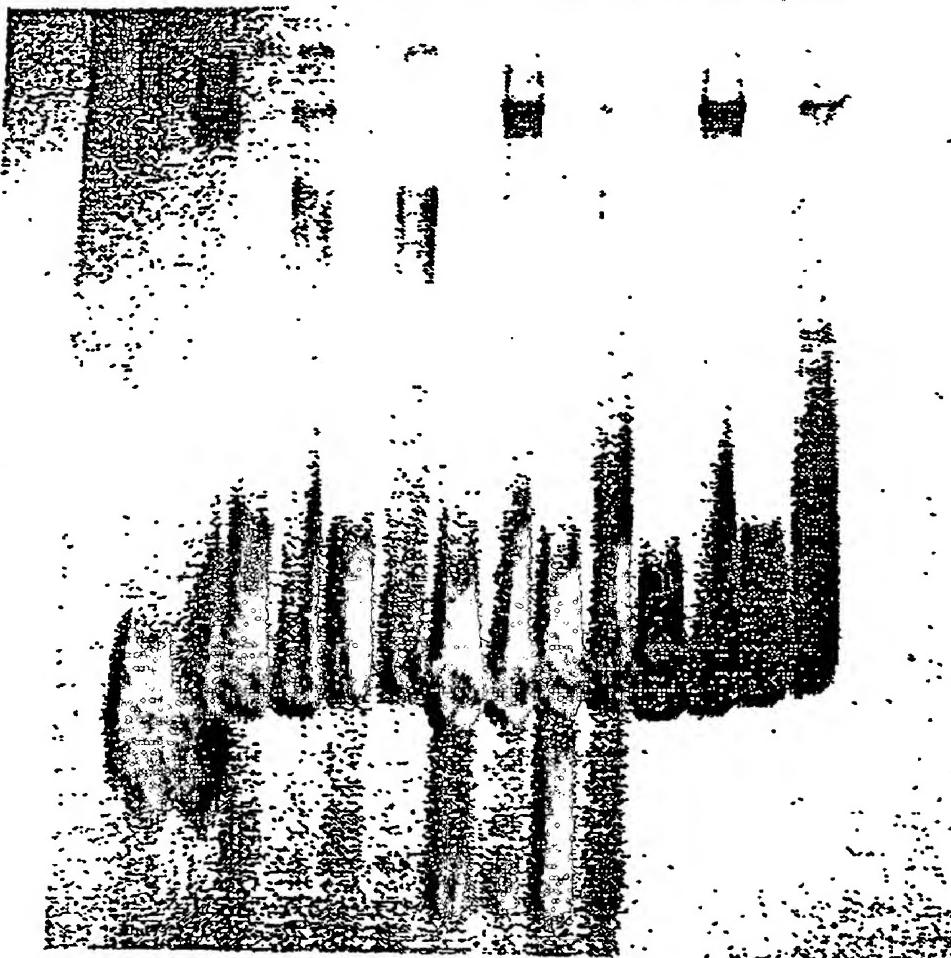


Figur 9



Figur 10

01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14



Figur 11